



João de Brito Correia da Luz

Licenciado em Bioquímica

**Bionanoconjugados de Citocromo Tri-
Hémico e Nanopartículas de Ouro para
Biorremediação de Cr(VI)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Ricardo Franco, Professor Auxiliar, UNL
Co-orientador: Carlos Salgueiro, Professor Auxiliar, UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Miguel R. Viana Baptista
Arguente: Prof. Doutora Eulália F. Alves Carvalho Pereira
Vogal: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro 2011

João de Brito Correia da Luz
Licenciado em Bioquímica (UNL)



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



Bionanoconjugados de Citocromo Tri-Hémico em Nanopartículas de Ouro para Biorremediação de Cr(VI)

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Professor Ricardo Franco
Co-orientador: Professor Carlos Salgueiro

Departamento de Química
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Indicação dos Direitos de Cópia

Bionanoconjugados de Citocromo Tri-Hémico em Nanopartículas de Ouro para Biorremediação de Cr(VI)

Indicação dos direitos de cópia em nome de João de Brito Correia da Luz, aluno nº31030, do Mestrado em Biotecnologia, da FCT/UNL e da UNL, referente à dissertação com o título “Bionanoconjugados de Citocromo Tri-Hémico em Nanopartículas de Ouro para Biorremediação de Cr(VI)”.

A Faculdade de Ciencias e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Mais um degrau ultrapassado... Este trabalho teria sido impossível realizar sem esforço, dedicação e principalmente apoio.

Gostaria de começar por agradecer ao Professor Ricardo Franco por todo o tempo que me dispensou, pelas orientações e caminhos que me delineou na realização deste trabalho.

Ao Professor Carlos Salgueiro pelo tempo que dispensou, orientação e apoio dado para a realização deste trabalho.

Ao grupo do laboratório de Bionanotecnologia, Dr. João Cortez, Inês O., Miguel, Leonor, Pedro, Inês G. e Jonnatan. Muito obrigado pela boa disposição e ajuda sempre disponível em todas as missões deste trabalho.

À minha família, aos meus pais, tios e prima, aos meus avós e principalmente ao meu avô cujo esforço e dedicação ao trabalho de uma vida inteira não só me inspira como também me possibilitou ter subido os degraus já ultrapassados, muito obrigado.

Uma palavra especial para a Cláudia que sempre está presente nestes momentos ajudando e apoiando tudo o que faço nunca querendo nada em troca. Sem ti seria sempre tudo mais difícil, muito obrigado.

A todos, obrigado!

Resumo

O presente estudo teve como principal objectivo estudar a formação de bionanoconjugados capazes de efectuar a biorremediação de Cr(VI), conjugando a capacidade de redução de Cr(VI) de uma proteína tri-hémica, PpcA, isolada de *Geobacter sulfurreducens*, com nanopartículas de ouro revestidas com ácido 11-mercaptoundecanóico (AuNP-MUA).

A proteína PpcA foi obtida através de um sistema de sobreexpressão recombinante em *Escherichia coli* e purificada utilizando técnicas cromatográficas de permuta iónica e exclusão molecular. As AuNP foram sintetizadas seguindo o método de redução por citrato formando uma solução de ouro coloidal em meio aquoso.

A formação dos bionanoconjugados foi caracterizada por diversas técnicas, nomeadamente medições de potencial zeta, electroforese em géis de agarose e espectroscopias de UV/Visível e de Ressonância Magnética Nuclear. Através destas técnicas foi possível comprovar a formação dos bionanoconjugados e determinar a quantidade de PpcA necessária para revestir totalmente a superfície das AuNP, concluindo-se que são necessárias 200 moléculas de PpcA para revestir totalmente a superfície de uma nanopartícula de ouro com um diâmetro médio de 15 nm. Foi possível também, através de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, determinar qual a região de interacção entre a PpcA e as AuNP. Esta região situa-se na vizinhança do hemo IV e envolve três segmentos de cadeia polipeptídica que incluem os resíduos 8-13, 44-48 e 67-71.

A estabilidade dos bionanoconjugados relativamente à agregação induzida pelo aumento da força iónica e pH foi avaliada por espectroscopia de UV/Visível determinando-se que os bionanoconjugados com uma razão [PpcA]/[AuNP-MUA] igual a 200 são estáveis a concentrações de NaCl até 1 M e a valores de pH superiores a 7 e inferiores a 11.

A capacidade redutora de Cr(VI) da PpcA foi avaliada por voltametria cíclica após imobilização da proteína num eléctrodo de óxido de estanho dopado com fluoreto (FTO) modificado com ouro nanoestruturado. Determinou-se que a PpcA é capaz de reduzir eficazmente o Cr(VI) a Cr(III) devido ao efeito catalítico desta proteína no processo de transferência electrónica.

Palavras-chave: Nanopartículas de Ouro (AuNP); PpcA; Biorremediação de Cr(VI); Bionanoconjugados

Abstract

The main objective of this study was to study the formation of bionanoconjugates that are able to perform the bioremediation of Cr(VI), coupling the reductive capability of the tri-hemic protein, PpcA, with MUA capped gold nanoparticles (AuNP-MUA).

The tri-heme cytochrome PpcA was obtained by a recombinant overexpression system in *E. coli* and purified by chromatographic techniques, namely, ionic exchange and size exclusion. AuNPs were synthesized by the citrate reduction method forming a stable colloidal gold solution.

The formation of the bionanoconjugates was followed by several complementary techniques such as zeta potential measurements, agarose gel electrophoresis, UV/Visible and Nuclear Magnetic Resonance spectroscopies. With these techniques it was possible to prove the conjugation between the PpcA and the AuNP and determine the protein amount required to fully coat the AuNP. This amount determined as 200 PpcA molecules per nanoparticle. Using Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy the interacting regions between PpcA and AuNPs were mapped. Such interaction involves three regions located in the neighborhood of the heme IV group, namely residues 8-13, 44-48 and 67-71.

The stability of the bionanoconjugates towards aggregation induced by increasing ionic strength and varying pH, was evaluated by UV/Visible spectroscopy and it was possible to determine that bionanoconjugates with a [PpcA]/[AuNP-MUA] ratio of 200 are stable at NaCl concentrations up to 1M and pH values above 7 and below 11.

The Cr(VI) reduction of PpcA was studied by cyclic voltammetry measurements of the immobilized protein in a fluoride tin oxide (FTO) electrode modified with nanostructured gold. It was determined that PpcA is effectively capable of reducing Cr(VI) to Cr(III) because of the catalytic effect in the electron transfer process, observed in the presence of PpcA.

Keywords: Gold Nanoparticles (AuNP); PpcA; Cr(VI) Bioremediation; Bionanoconjugates

Índice

Indicação dos Direitos de Cópia	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice de Figuras	xv
Lista de Abreviaturas	xix
1 Introdução Teórica	3
1.1 Biorremediação	3
1.1.1 Conceitos Gerais	3
1.1.2 Vantagens e Desvantagens do uso de Biorremediação.....	3
1.1.3 Tipos de contaminantes	4
1.1.4 Tecnologias utilizadas em Biorremediação.....	4
1.1.5 Biorremediação de Metais.....	5
1.1.6 Crómio: Conceitos Gerais e um pouco de História.....	5
1.1.7 Actuais aplicações de Crómio	6
1.1.8 Toxicidade de Cr(VI)	7
1.1.9 Biorremediação de Cr(VI).....	7
1.1.10 A bactéria <i>Geobacter sulfurreducens</i>	8
1.2 Citocromo c tri-hémico: PpcA.....	9
1.2.1 Características Gerais.....	9
1.2.2 Papel Fisiológico da PpcA.....	10
1.2.3 Sobreexpressão da PpcA.....	10
1.2.4 Purificação da PpcA.....	10
1.2.5 Espectroscopia de UV/Visível da PpcA	12
1.2.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 2D-[¹ H- ¹⁵ N]-HSQC.....	14
1.3 Bionanotecnologia	15
1.3.1 Conceitos gerais	15

1.3.2	Nanopartículas.....	15
1.3.3	Nanopartículas Metálicas: Ressonância Plasmónica de Superfície.....	15
1.3.4	Nanopartículas de Ouro: Métodos de Síntese	17
1.3.5	Determinação da concentração da solução de AuNP	18
1.3.6	Estabilidade das AuNP	19
1.3.7	Funcionalização e Aplicações Biotecnológicas das AuNP	20
1.3.8	Técnicas para avaliar Conjugação de proteínas a AuNPs.....	22
1.3.9	Técnicas electroquímicas para determinação da actividade da PpcA: Voltametria Cíclica	24
1.3.10	Modificação de eléctrodos: Deposição de ouro e Imobilização de Biomoléculas	25
1.4	Abordagem bionanotecnológica para biorremediação de cromato.....	26
2	Parte Experimental.....	31
2.1	Sobreexpressão e Purificação da PpcA	31
2.1.1	Transformação de <i>Escherichia coli</i> BL21/pEC86 com o plasmídeo pCK32	31
2.1.2	Crescimento da cultura de transformantes e expressão de PpcA recombinante ...	31
2.1.3	Isolamento da fracção periplasmática da cultura de <i>Escherichia coli</i> BL21/pEC8631	
2.1.4	Purificação e doseamento de PpcA recombinante.....	32
2.2	Síntese e Estabilidade das Nanopartículas de Ouro.....	32
2.2.1	Síntese e funcionalização das Nanopartículas de Ouro	32
2.2.2	Estabilidade das Nanopartículas de Ouro a diferentes concentrações de NaCl.....	33
2.2.3	Estabilidade das Nanopartículas de Ouro a diferentes valores de pH	33
2.3	Formação de Bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA.....	33
2.3.1	Preparação dos Bionanoconjugados	33
2.3.2	Estudo da formação dos bionanoconjugados por espectroscopia de UV/Visível ...	34
2.3.3	Medição do Potencial Zeta dos bionanoconjugados	34
2.3.4	Electroforese dos bionanoconjugados em géis de agarose	34
2.3.5	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear dos bionanoconjugados.....	35
2.4	Estabilidade dos Bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA	35
2.4.1	Estabilidade dos bionanoconjugados a diferentes concentrações de NaCl	35
2.4.2	Estabilidade dos bionanoconjugados a diferentes valores de pH.....	36

2.4.3	Estabilidade à agregação por NaCl dos bionanconjugados de PpcA e AuNP-MUA ao longo do tempo	36
2.5	Actividade da PpcA na Detecção Electroquímica de Cromato	36
2.5.1	Sistema Electroquímico	36
2.5.2	Montagem do eléctrodo nanoestruturado FTO-Au	37
2.5.3	Preparação dos Bionanoeléctrodos de FTO-Au-PpcA	37
3	Apresentação e Discussão dos Resultados	41
3.1	Sobreexpressão e Purificação da PpcA	41
3.1.1	Purificação da PpcA	41
3.2	Síntese e Estabilidade das Nanopartículas de Ouro	42
3.2.1	Síntese e funcionalização das Nanopartículas de Ouro	42
3.2.2	Estabilidade das Nanopartículas de Ouro a diferentes concentrações de NaCl	43
3.2.3	Estabilidade das Nanopartículas de Ouro a diferentes valores de pH	46
3.3	Formação dos Bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA	48
3.3.1	Medições de Potencial Zeta dos Bionanoconjugados	48
3.3.2	Estudo da formação de bionanoconjugados por espectroscopia de UV/Visível	50
3.3.3	Estudo da mobilidade electroforética dos bionanoconjugados em géis de agarose... ..	56
3.3.4	Estudo da conjugação através de espectroscopia de RMN	58
3.4	Estudo da estabilidade dos bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA	64
3.4.1	Estabilidade dos bionanoconjugados a diferentes concentrações de NaCl	64
3.4.2	Estabilidade à agregação por NaCl dos bionanoconjugados ao longo do tempo	69
3.4.3	Estabilidade dos bionanoconjugados a diferentes valores de pH	73
3.5	Actividade da PpcA na Detecção Electroquímica de Cromato	79
3.5.1	Estudos das propriedades electroquímicas do eléctrodo nanoestruturado de FTO-Au	79
3.5.2	Montagem do bionanoeléctrodo de FTO-Au-PpcA e estudo das suas propriedades electroquímicas	81
3.5.3	Estudo da detecção e redução de CrO_4^{2-} com o bionanoeléctrodo de FTO-Au-PpcA	84
4	Conclusões	89

5	Bibliografia.....	95
6	Apêndice I.....	103
6.1.1	Composição do meio de cultura 2xYT	103
6.1.2	Composição do tampão de lise (pH 8).....	103
6.1.3	Cromatogramas	104
7	Apêndice II.....	109
7.1	Estudo da formação dos bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA	109
7.1.1	Estudo da formação de bionanoconjugados por espectroscopia de UV/Visível... ..	109
7.1.2	Estudo da mobilidade electroforética dos bionanoconjugados em géis de agarose... ..	109
7.2	Estudo da estabilidade dos bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA	110
7.2.1	Estabilidade dos bionanoconjugados a diferentes concentrações de NaCl	110
7.2.2	Estabilidade à agregação por NaCl dos bionanoconjugados ao longo do tempo.	114

Índice de Figuras

Fig. 1.1 – Estrutura da proteína PpcA, obtida por espectroscopia de RMN. A estrutura foi retirada do PDB (código de acesso 2LDO) e preparada utilizando o software Chimera (UCSF, San Francisco, EUA).....	9
Fig. 1.2 – Esquema ilustrativo do processo de cromatografia de permuta iónica ⁴³	11
Fig. 1.3 – Esquema ilustrativo do processo de cromatografia de exclusão molecular ⁴³	12
Fig. 1.4 – Espectro UV/Visível de um citocromo <i>c</i> FerA na forma oxidada (linha a tracejado) e na forma reduzida (linha contínua), espectro adaptado de <i>Magnuson et al.</i> ⁴⁴	13
Fig. 1.5 – Representação esquemática de um grupo hemo coordenado axialmente com um resíduo de histidina ⁴⁶	14
Fig. 1.6 – Esquema representativo da interacção de radiação electromagnética com uma nanoesfera metálica ⁵⁴	16
Fig. 1.7 – Espectro de UV/Visível de uma solução de AuNP. Fotografia de uma solução de AuNP.	18
Fig. 1.8 – Espectros de UV/Visível de soluções de AuNP não agregada (linha vermelha) e agregada (linha azul). Fotografias de uma solução de AuNP estável (esquerda) e agregada (direita).	20
Fig. 1.9 – Esquema representativo de uma nanopartícula de ouro funcionalizada com ácido 11-mercaptopundecanóico.	22
Fig. 1.10 – Representação esquemática, adaptada ⁹⁷ , do potencial zeta.	23
Fig. 1.11 – Esquema representativo proposto para biorremediação de Cr(VI), baseado em bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA.	27
Fig. 3.1 - Espectro de UV/Visível da PpcA na forma oxidada (linha azul) e na forma reduzida (linha vermelha).	42
Fig. 3.2 - Espectro de UV/Visível de uma solução de AuNP.....	43
Fig. 3.3- Espectros de UV/Visível de AuNP-MUA com concentração de 3 nM (A) e 1 nM (B), com diferentes concentrações de NaCl.	44
Fig. 3.4 - Gráfico da razão de agregação das AuNP-MUA de 3 nM (preto) e de 1 nM (azul) em função da concentração de NaCl.....	45
Fig. 3.5 - Espectros de UV/Visível de AuNP-MUA (3 nM) a diferentes valores de pH.	47
Fig. 3.6 - Gráfico da razão de agregação das AuNP-MUA de 3 nM em função do pH.	48
Fig. 3.7 - Gráfico dos valores do potencial zeta em função da razão [PpcA]/[AuNP-MUA] de bionanoconjugados (AuNP 3 nM).	49
Fig. 3.8 - Gráfico da variação do potencial zeta em função da razão [PpcA]/[AuNP-MUA] de bionanoconjugados. A linha contínua representa o ajuste efectuado, através da aplicação Solver do Microsoft Excel, utilizando a equação adaptada das isotérmicas de adsorção de Langmuir ^{82,89} (Equação 2).	50

Fig. 3.9 – Espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA (3 nM) com diferentes razões (R), sendo $R = [PpcA]/[AuNP-MUA]$	51
Fig. 3.10 – Gráfico do desvio do comprimento de onda da plasmónica em função da razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$	52
Fig. 3.11 – Espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados sem a contribuição da PpcA e das AuNP-MUA.	53
Fig. 3.12 – Simulação do espectro dos bionanoconjugados ($R = 200$) de PpcA e AuNP-MUA através do software PeakFit v4.12.....	54
Fig. 3.13 – Gráfico da amplitude da banda de Soret da PpcA (preto) e dos bionanoconjugados (vermelho) em função da concentração de PpcA.....	54
Fig. 3.14 – Gráfico do comportamento da área da banda, dos bionanoconjugados, a 550 nm, simulada pelo PeakFit v4.12, em função da razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$. A linha contínua representa o ajuste efectuado, através da aplicação Solver do Microsoft Excel, utilizando a equação adaptada das isotérmicas de adsorção de Langmuir ^{82,89} , apresentada na “Introdução Teórica”.	55
Fig. 3.15 – Gráfico da variação do potencial zeta (preto) e do comportamento da banda a 550 nm (cinzento), dos bionanoconjugados, em função da razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$. As linhas contínuas representam o ajuste efectuado, através da aplicação Solver do Microsoft Excel, utilizando a equação adaptada das isotérmicas de adsorção de Langmuir ^{82,89} , apresentada na “Introdução Teórica”.....	56
Fig. 3.16 – Esquema da separação dos eléctrodos no sistema de electroforese. Fotografias de electroforeses em géis de agarose de 0,5%, com 15 (esquerda) ou 8 (direita) poços, de bionanoconjugados com razões $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ diferentes, indicadas sobre o poço respectivo. Os géis correram durante 30 minutos com 150V com tampão TAE 1/8X a pH 8,5.	57
Fig. 3.17 – Gráficos da mobilidade electroforética dos bionanoconjugados nos géis de agarose 0,5%, com 15 (esquerda) e 8 (direita) poços, em função da razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$	57
Fig. 3.18 – Espectro de RMN. 1D [¹ H] da PpcA livre (preto) e dos bionanoconjugados com razões $[PpcA]/[AuNP]$ de 600 (verde), 400 (vermelho) e 200 (azul), a 25°C e pH 8. As setas indicam os sinais mais afectados pela conjugação.	59
Fig. 3.19 – Espectro de RMN 2D-[¹ H- ¹⁵ N]-HSQC da PpcA livre (preto) e dos bionanoconjugados de razão $[PpcA]/[AuNP]$ igual a 200 (azul), a 25°C e pH 8. Os números correspondem aos sinais dos grupos NH da cadeia polipeptídica da PpcA. Os sinais que apresentam maiores desvios aquando da conjugação estão assinalados com setas, no espectro da PpcA livre, e com círculos a vermelho, no espectro dos bionanoconjugados.	60
Fig. 3.20 – Secção do espectro 2D-[¹ H- ¹⁵ N]-HSQC da PpcA (preto) e dos bionanoconjugados de razão $[PpcA]/[AuNP]$ igual a 200 (azul), a 25°C e pH 8.	61
Fig. 3.21 – Espectro de RMN 2D-[¹ H- ¹⁵ N]-HSQC da PpcA (preto) e dos bionanoconjugados de razão $[PpcA]/[AuNP]$ igual a 400 (vermelho), a 25°C e pH 8.	62

Fig. 3.22 – Secção do espectro 2D-[^1H - ^{15}N]-HSQC da PpcA (preto) e dos bionanoconjugados de razão $[\text{PpcA}]/[\text{AuNP}]$ igual a 400 (vermelho), a 25°C e pH 8.	63
Fig. 3.23 – Esquemas representativos da superfície da PpcA, coloridos de acordo com o contacto entre esta e a nanopartícula: vermelho – zona de maior contacto; amarelo – zona de menor contacto; rosa – grupo hemo; e cinzento - zonas sem contacto. Estrutura retirada do PDB (código de acesso 2LDO) e preparada utilizando o software Chimera (UCSF, San Francisco, EUA). A figura da direita é uma rotação de 180° relativamente à figura da esquerda.	64
Fig. 3.24 - Espectros de UV/Visível de bionanoconjugados (com 3 nM de AuNP-MUA), com diferentes razões $R = [\text{PpcA}]/[\text{AuNP-MUA}]$, a diferentes concentrações de NaCl.	66
Fig. 3.25 - Gráfico das razões de agregação dos bionanoconjugados (3 nM de AuNP-MUA), de diferentes razões $[\text{PpcA}]/[\text{AuNP-MUA}]$, em função da concentração de NaCl.	67
Fig. 3.26 – Gráfico dos pontos de inflexão das curvas de agregação em função da razão $[\text{PpcA}]/[\text{AuNP-MUA}]$	68
Fig. 3.27 – Espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados de razão 75, com 1 (A), 8 (B) e 30 (C) dias de conjugação, a diferentes concentrações de NaCl.	70
Fig. 3.28 – Gráfico da de agregação dos bionanoconjugados (3 nM de AuNP-MUA) de razão $[\text{PpcA}]/[\text{AuNP-MUA}] = 75$ com diferentes dias de conjugação, em função da concentração de NaCl.	71
Fig. 3.29 – Espectros da banda de Soret dos bionanoconjugados com diferentes tempos de agregação.	72
Fig. 3.30 – Espectros da banda da plasmónica dos bionanoconjugados com diferentes tempos de conjugação.	73
Fig. 3.31- Espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados ($R = 200$) de PpcA e AuNP-MUA (3 nM em AuNP) a diferentes valores de pH (não agregação representada em escala cinza; agregação representada com cor), acertados de forma lenta.	74
Fig. 3.32 – Espectros de UV/Visível da PpcA a 600 nM a diferentes valores de pH.	75
Fig. 3.33 – Gráfico das razões de agregação dos bionanoconjugados ($R = 200$) de PpcA e AuNP-MUA (3 nM em AuNP) em função do pH.	76
Fig. 3.34 – Espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados ($R = 200$) de PpcA e AuNP-MUA (3 nM em AuNP) a diferentes valores de pH (não agregação representada em <i>greyscale</i> ; agregação representada com cor), acertados de forma brusca.	77
Fig. 3.35 – Espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados a diferentes valores de pH, 6 horas após o acerto de pH de forma brusca.	78
Fig. 3.36 – Electrodeposição de ouro sobre o eléctrodo de FTO por voltametria cíclica com velocidade de 0,010 V/s. Inserida ampliação da região entre -0,75 V e -1,05 V.	79
Fig. 3.37 – Voltametria cíclica de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mM utilizando um eléctrodo de FTO (linha contínua) e um eléctrodo de FTO após deposição de 5 camadas de ouro (linha picotada).	80
Fig. 3.38 – Esquema representativo do processo de montagem do bionanoeléctrodo.	81

Fig. 3.39 – Voltametria cíclica de $K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mM utilizando o eléctrodo de FTO com 5 camadas de ouro (linha contínua), o mesmo eléctrodo após modificação com MPA (linha tracejada) e o eléctrodo após ligação da PpcA à sua superfície (linha picotada).....	82
Fig. 3.40 - Voltametria cíclica da PpcA em solução aquosa com KNO_3 0,1 M e tampão fosfato 10 mM pH 7, utilizando o eléctrodo FTO-Au com diferentes velocidades de varrimento.....	83
Fig. 3.41 - Voltametria cíclica da PpcA imobilizada sobre o eléctrodo de FTO-Au com velocidades de varrimento diferentes, numa solução aquosa de KNO_3 0,1 M e tampão fosfato 10 mM pH 7.	83
Fig. 3.42 - Voltametria cíclica em tampão fosfato 10 mM pH 7 e KNO_3 0,1 M utilizando o eléctrodo FTO-Au (linha contínua), o eléctrodo FTO-Au-PpcA (linha tracejada) e o mesmo eléctrodo numa solução onde foi adicionado CrO_4^{2-} 25 mM (linha picotada), com uma velocidade de varrimento de 0,2 V/s.....	84
Fig. 6.1 – Cromatograma da purificação da PpcA por cromatografia de permuta iónica num sistema Äktaprime Plus (A) e com <i>zoom</i> na zona das bandas da eluição da PpcA (B), ver condições experimentais “Parte Experimental”.	104
Fig. 6.2 – Cromatograma da purificação da PpcA por cromatografia de exclusão molecular num sistema Äktaprime Plus (A) e com <i>zoom</i> na zona da banda de eluição da PpcA (B), ver condições experimentais em “Parte Experimental”.	105
Fig. 7.1 – Espectro de UV/Visível da PpcA a diferentes concentrações.	109
Fig. 7.2 - Esquema da separação dos eléctrodos no sistema de electroforese. Fotografias de electroforeses em géis de agarose de 1% (esquerda) e 2% (direita), de bionanoconjugados com razões $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ diferentes, indicadas sobre o poço respectivo. Os géis correram durante 30 minutos com 150V com tampão TAE 0,125X a pH 8,5.	109
Fig. 7.3 - Espectros de UV/Visível de bionanoconjugados (com 3 nM de AuNP-MUA), com diferentes razões $R = [PpcA]/[AuNP-MUA]$, a diferentes concentrações de NaCl.	113
Fig. 7.4 - Espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados de razão 75, com 2 (A), 3 (B) e 15 (C) dias de conjugação, a diferentes concentrações de NaCl.	115

Lista de Abreviaturas

1D – Unidimensional

2D - Bidimensional

AMP- Ampicilina

AuNP – Nanopartículas de Ouro

AuNP-MUA – Nanopartículas de Ouro funcionalizadas com Ácido 11-Mercapto-Undecanóico

CLO – Cloranfenicol

DNA – Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

EDC – 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

FTO – Fluoride Tin Oxide (Óxido de estanho dopado com fluoreto)

IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida

HSQC – Heteronuclear single-quantum coherence (Coerência heteronuclear de quântica única)

MPA – Ácido 3-Mercaptopropanóico

MUA – Ácido 11-Mercaptoundecanóico

NHS – N-Hidroxisuccinamida

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

Capítulo I: Introdução Teórica

1 Introdução Teórica

1.1 Biorremediação

1.1.1 Conceitos Gerais

A maioria dos contaminantes orgânicos e muitos dos inorgânicos são sujeitos a ataques enzimáticos através do metabolismo de organismos vivos¹.

A biorremediação consiste na utilização de agentes biológicos na transformação, destruição ou imobilização de contaminantes ambientais de forma a proteger receptores potencialmente sensíveis. Nestes agentes biológicos podem-se incluir plantas e microrganismos como bactérias e fungos e até as suas enzimas¹.

As tecnologias de biorremediação são geralmente classificadas como *in situ* ou *ex situ*. As tecnologias *in situ* consistem em tecnologias utilizadas no tratamento de determinado poluente no próprio local contaminado. As tecnologias *ex situ* envolvem primeiramente a remoção do contaminante que terá de ser tratado noutro local.

1.1.2 Vantagens e Desvantagens do uso de Biorremediação

As vantagens da aplicação de biorremediação são várias, em que se podem destacar:

- O tratamento pode ocorrer *in situ*, o que elimina os custos de transporte de resíduos perigosos;
- Os compostos orgânicos podem ser destruídos em vez de serem transferidos de uma fase para outra, eliminando a responsabilidade a longo prazo;
- Baseia-se em processos naturais, que são mais baratos e mais rápidos;
- A biorremediação *in situ* envolve o mínimo de alteração do local;
- Sustentabilidade ambiental;
- Pode ser usada em conjunto com outras tecnologias.

Um exemplo das vantagens acima enunciadas é o custo/eficiência no uso de biorremediação em áreas de difícil ou impossível acesso sem recorrer à escavação do local, como é o caso de derrames de hidrocarbonetos ou solventes clorados que podem contaminar lençóis freáticos. Ao introduzir no terreno um aceitador ou dador de electrões apropriado, conforme os casos, pode-se reduzir eficientemente as concentrações do contaminante. Esta técnica é bem menos dispendiosa que o uso de escavação seguida de despejos, incineração e substitui a técnica de *pump and treat* nos casos onde existe contaminação das águas subterrâneas².

No entanto também existem algumas desvantagens no processo de biorremediação:

- Alguns poluentes, como os metais pesados, podem não ser completamente eliminados por processos biológicos;
- Pode necessitar de uma monitorização intensiva;
- Os requisitos para a eliminação efectiva dos poluentes podem variar de local para local;
- A concentração do poluente pode limitar a acção do agente biológico;
- Pode ocorrer acumulação de metabolitos tóxicos.

1.1.3 Tipos de contaminantes

Os contaminantes ambientais são substâncias que são introduzidas, propositada ou acidentalmente, no ambiente e que poderão ter potencial para danificar tanto o próprio local como os seres vivos que nele habitam.

Os contaminantes ambientais são divididos em duas categorias, orgânicos e inorgânicos. Os principais contaminantes orgânicos são os hidrocarbonetos aromáticos, solventes halogenados e pesticidas. Os principais contaminantes inorgânicos são o nitrato, arsénio, selénio, chumbo, cádmio, crómio e mercúrio³.

1.1.4 Tecnologias utilizadas em Biorremediação

Existem diferentes tecnologias que são utilizadas em biorremediação. A mais simples e mais barata é a Biorremediação Intrínseca que consiste na combinação de processos naturais, químicos e biológicos, sem intervenção humana em que os próprios microrganismos existentes no local contaminado são capazes de tratar os contaminantes. Esta tecnologia tem a vantagem de ser bastante simples e barata no entanto requer muito tempo para alcançar os objectivos e necessita de muita monitorização.

As técnicas mais importantes utilizadas em biorremediação são a Bioestimulação e o “Bioaugmenting”¹.

A Bioestimulação consiste na estimulação dos agentes biológicos já existentes no local contaminado. A estimulação é feita introduzindo nutrientes e aceitadores de electrões de modo a aumentar a concentração de microrganismos no meio. Alguns exemplos deste tipo de tecnologia são o bioarejamento, que consiste na utilização de bombas de vácuo para promover a circulação de ar no local contaminado; sistemas de circulação de água em que a água subterrânea é extraída do local contaminado e tratada à superfície, com nutrientes e oxigénio, sendo posteriormente injectada no local.

O “Bioaugmenting” consiste em aumentar a quantidade de microrganismos no local contaminado, inserindo, por injeção, culturas enriquecidas com microrganismos capazes de degradar ou transformar o contaminante em questão.

A engenharia genética é também uma tecnologia com grande potencial para ser utilizada em biorremediação, havendo modificação genética de microrganismos de modo a criar microrganismos especificamente desenhados para biorremediação de determinado contaminante^{4,5}. Um exemplo de aplicação desta tecnologia consistiu na modificação da bactéria *Deinococcus radiodurans*, o organismo conhecido com maior resistência à radiação. Esta bactéria foi geneticamente modificada de modo a metabolizar tolueno e mercúrio iónico para o tratamento de lixo nuclear altamente reactivo⁶.

1.1.5 Biorremediação de Metais

Os contaminantes orgânicos como os hidrocarbonetos aromáticos são biodegradados pelos microrganismos em CO₂ e H₂O, no entanto tal não acontece com os contaminantes inorgânicos. Os metais pesados não são rapidamente absorvidos ou capturados pelos microrganismos e a bioacumulação deste tipo de metais é algo a evitar.

A biorremediação de metais não consiste na degradação do contaminante mas sim na sua transformação para uma forma menos tóxica e perigosa. Existem metais que são menos solúveis e mais voláteis nas formas reduzidas do que na forma oxidada, como tal, uma tecnologia utilizada na biorremediação deste tipo de contaminantes é a redução dissimilatória de metais⁷. Os metais que podem ser reduzidos de formas solúveis para insolúveis são o urânio, crómio, selénio, chumbo e tecnésio, sendo que o mercúrio pode ser reduzido para uma forma volátil^{7,8}.

1.1.6 Crómio: Conceitos Gerais e um pouco de História

O crómio é um elemento químico com o símbolo Cr e número atómico 24 e é o primeiro elemento do grupo 6 da tabela periódica. É considerado um metal pesado e o interesse neste elemento surgiu devido à sua grande resistência à corrosão e pela sua dureza. Uma grande descoberta acerca deste metal foi que poderia tornar o aço altamente resistente à corrosão e descoloração juntando crómio e formando assim o aço inoxidável.

O crómio apresenta uma grande variedade de estados de oxidação em que o +3 é o estado termodinamicamente mais estável e os estados +6 e +3 são os estados de oxidação mais abundantes dos compostos de crómio⁹.

Historicamente o crómio é um metal de grande importância pois a sua utilização, devido à protecção anti-corrosiva que oferece aos metais comumente utilizados pela Humanidade. A primeira utilização conhecida deste metal remonta ao terceiro século AC, na

Dinastia Qin dos Guerreiros de Terracota, na China¹⁰. Foram encontrados por arqueólogos artefactos bélicos, como pontas de setas e espadas de bronze, sepultadas há mais de 2000 anos mas não apresentavam qualquer sinal de corrosão pois o bronze tinha sido revestido com crómio¹⁰.

No entanto, este metal ficou conhecido no mundo ocidental, não pelas suas propriedades anti-corrosivas, mas pelas suas propriedades visuais, nomeadamente a sua cor em determinados compostos. Foi descoberto no século XVIII que alguns minérios contendo crómio poderiam ser utilizados como pigmentos para tintas, devido às intensas cores que apresentavam¹¹. Durante os anos 1800 o crómio era maioritariamente utilizado como componente de tintas e de sais de curtume¹¹.

Este metal é também conhecido pelo brilho que apresenta quando polido e, como tal, foi e é utilizado como agente protector e decorativo em peças automóveis, materiais de canalização, peças de mobília e outros tipos de materiais, é habitualmente aplicado por electrodeposição (galvanização)¹².

1.1.7 Actuais aplicações de Crómio

Actualmente o crómio é utilizado em diversas áreas industriais de elevada importância para a sociedade moderna.

A sua utilização na Metalurgia é a mais conhecida e também de maior importância. O desenvolvimento de aço inoxidável, que é a liga metálica à prova de corrosão mais utilizada no Mundo, é formado aquando da adição de crómio, ao ferro, em concentrações geralmente superiores a 11%¹³. Nesta indústria o crómio é também utilizado como agente protector e decorativo de certos materiais já acima descritos como peças automóveis, materiais de canalização e peças de mobília em que a deposição é feita por galvanização¹². Outra utilização do crómio neste tipo de indústria é também a protecção em metais sensíveis à oxidação, como o zinco, cádmio e alumínio¹⁴.

A utilização de crómio como corante e pigmento é devida à intensa cor que certos minerais de crómio apresentam. O amarelo cromado é um dos pigmentos amarelos mais utilizados. Este pigmento não é fotodegradável e contém uma cor bastante intensa e um exemplo da sua utilização são os autocarros escolares nos E.U.A. que apresentam a característica cor amarela¹⁵. A cor verde da esmeralda e de alguns vidros, tal como a cor vermelha dos rubis sintéticos são causadas pela presença de crómio nas suas composições^{16,17}.

O crómio também é utilizado em curtumes de couro, o crómio no estado de oxidação +3, Cr(III), estabiliza o couro através de ligações cruzadas entre as fibras de colagénio¹⁸.

Outro tipo de utilização deste metal é a utilização da sua toxicidade, nomeadamente do crómio no estado de oxidação +6, Cr(VI), na preservação de madeiras. O óxido de Crómio

(CrO₃) é utilizado em concentrações entre 35,3% e 65,5% em agentes de preservação de madeiras de modo a proteger este material de fungos, insectos comedores de madeira, nomeadamente térmitas¹⁹.

1.1.8 Toxicidade de Cr(VI)

O crómio não possui qualquer papel biológico que se conheça e recentemente foi classificado como um elemento não essencial em mamíferos²⁰. Apesar disso, até aos dias de hoje têm existido suplementos alimentares com quantidades vestigiais de crómio, nomeadamente Cr(III) que em pequenas quantidades aparenta ser benigno^{21,22}. No entanto a toxicidade e propriedades carcinogénicas do Cr(VI) são conhecidas há já bastante tempo²³.

Pode-se considerar como Cr(VI) todos os compostos contendo crómio no estado de oxidação +6, nomeadamente os sais de cromato e dicromato. Estes compostos são muito utilizados nas aplicações já acima descritas para este metal.

Ao entrar no organismo os compostos de Cr(VI) que são reduzidos, por diversos mecanismos, a Cr(III) são excretados pois o Cr(III) não consegue penetrar nas células, mas estudos indicam que grandes quantidades de Cr(III) no interior das células potenciam danos do DNA²². No entanto, o Cr(VI) é considerado extremamente tóxico, genotóxico e carcinogénico pois consegue penetrar nas células devido à semelhança do ião cromato com os iões sulfato e fosfato, entrando para as células através dos mecanismos de transporte destes dois iões²⁴.

O mecanismo de genotoxicidade do Cr(VI) deve-se ao facto deste entrar nas células na forma de cromato e ao ser reduzido para Cr(III), por agentes redutores existentes no interior da célula, como o Ácido Ascórbico, irão ser produzidos, como subprodutos, radicais hidroxilo que irão danificar, por stress oxidativo, o DNA²⁴⁻²⁶. O Cr(III) produzido por este mecanismo no interior das células irá interagir com o DNA formando aductos^{24,27}.

Assim, como o Cr(VI) apresenta graves problemas de toxicidade e tem sido largamente utilizado em vários tipos de indústrias é necessário, além de procurar alternativas à sua utilização, haver limpeza e remediação do Cr(VI) existentes nos solos e nas águas subterrâneas.

1.1.9 Biorremediação de Cr(VI)

A biorremediação de Cr(VI) é de grande interesse e tem sido procurada uma forma eficaz de tratar locais contaminados com este metal. A forma que mais tem sido estudada é a redução dissimilatória de metais, neste caso o Cr(VI). Este tipo de tecnologia consiste em reduzir o metal, que está numa forma solúvel, para uma forma insolúvel. Por exemplo, o Cr(VI) que é altamente tóxico e solúvel, pode ser reduzido a Cr(III) que é menos tóxico devido à impossibilidade de entrar nas células e também pouco solúvel^{7,8,28}.

Como tal, tem havido grande procura de agentes de biorremediação para Cr(VI) através da redução dissimilatória. Os agentes de biorremediação com grandes potencialidades para realizar este tipo de redução são microrganismos como bactérias⁷.

Têm existido também conjugação das técnicas de bioestimulação e “bioaugmenting” com a redução dissimilatória de metais. Tem havido procura de bactérias capazes de efectivamente reduzir o Cr(VI), para serem aplicadas através de “bioaugmenting” em locais muito contaminados por este metal²⁹⁻³¹. Vários microrganismos possuem a capacidade de redução de Cr(VI) a Cr(III), no entanto, sabe-se que o Cr(VI) existente nas águas subterrâneas é de origem antropogénica e como tal a capacidade redutora deste metal por parte destas bactérias não faz parte do metabolismo principal destes microrganismos, sendo levado a cabo por enzimas com outras funções fisiológicas³⁰.

Um microrganismo com grande potencial para a biorremediação de Cr(VI), por redução dissimilatória, é a *Geobacter sulfurreducens*. Esta bactéria tem sido estudada como um dos principais dadores de electrões para células de combustível de base microbiana³² e como tal o seu potencial para doar electrões faz com que esta bactéria seja bastante interessante para a biorremediação de Cr(VI)⁷.

1.1.10 A bactéria *Geobacter sulfurreducens*

Os microrganismos pertencentes à família *Geobacteraceae* têm já bastantes aplicações biotecnológicas para biorremediação e, apesar, de serem classificados como anaeróbios obrigatórios, é conhecida alguma tolerância por parte destes a condições aeróbias⁷. Dos microrganismos pertencentes a esta família, aquele de maior interesse, no âmbito deste trabalho, é a *Geobacter sulfurreducens*. Esta bactéria tem a capacidade de ser um agente de biorremediação *in situ* de diversos contaminantes, devido à sua capacidade para reduzir diversos metais e oxidar matéria orgânica^{32,33}, poluentes comuns de ambientes naturais como as águas subterrâneas. Para além disso, foi demonstrada a capacidade deste microrganismo em transferir electrões para a superfície de eléctrodos acoplada à oxidação de matéria orgânica. Por estas razões, a bactéria *Geobacter sulfurreducens* tem sido alvo de intensa pesquisa tendo em vista a elucidação dos seus mecanismos de transferência electrónica^{7,34}.

A grande capacidade de transferência electrónica desta bactéria está relacionada com a expressão de mais de 100 citocromos do tipo c, parte dos quais poderão ser fundamentais na formação do gradiente electroquímico conducente à síntese de ATP³⁴. Neste grupo inclui-se uma família formada por cinco citocromos tri-hémicos periplasmáticos e, em particular a proteína PpcA³⁵.

1.2 Citocromo c tri-hémico: PpcA

1.2.1 Características Gerais

A PpcA é uma pequena proteína, periplasmática, com 71 aminoácidos, massa molecular de 9,57³⁶⁻³⁸ kDa, ponto isoelétrico de 9,44^{36,37,39} e contém 3 grupos hemo do tipo c, ou seja, covalentemente ligados à estrutura da proteína^{36,37}. Esta proteína contém uma pequena região de folhas β e 6 pequenas regiões em hélice α , sendo que 3 destas incluem zonas típicas da cadeia polipeptídica (CXXCH) que promovem a ligação covalente dos grupos hemo através das duas cisteínas e da histidina (Figura 1.1). Os grupos hemo são designados por I, III e IV e não I, II e III por concordância com a literatura. De facto, a nomenclatura adoptada para os citocromos tri-hémicos é baseada na homologia observada na disposição espacial dos grupos hemo com os citocromos tetra-hémicos c_3 ³⁵. Para além destas características estruturais é de salientar que 24% dos aminoácidos constituintes desta proteína são resíduos de lisina, o que lhe confere uma forte carga superficial positiva à proteína³⁷. Esta proteína apresenta potenciais de redução bastante negativos (-154 mV para o hemo I, -138 mV para o hemo III e -125mV para o hemo IV)³⁵ o que pode indicar que a PpcA possui um papel fisiológico importante na transferência electrónica do metabolismo da *Geobacter sulfurreducens*.

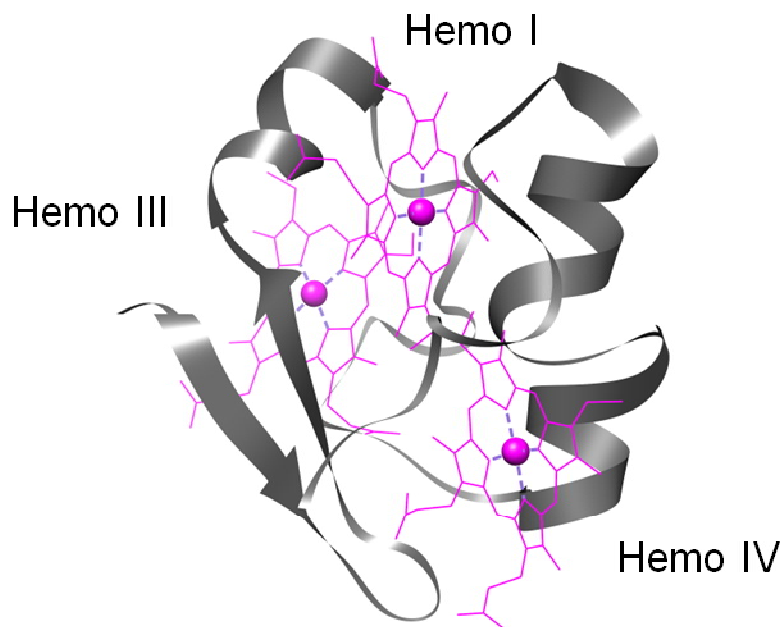


Fig. 1.1 – Estrutura da proteína PpcA, obtida por espectroscopia de RMN. A estrutura foi retirada do PDB (código de acesso 2LDO) e preparada utilizando o software Chimera (UCSF, San Francisco, EUA).

1.2.2 Papel Fisiológico da PpcA

O papel fisiológico da PpcA tem sido amplamente estudado de modo a esclarecer como esta proteína influencia tanto o crescimento da bactéria *Geobacter sulfurreducens* bem como na sua capacidade redutora de metais desta bactéria^{36,40}. Um estudo bastante importante que ajuda a clarificar o papel desta proteína envolveu o silenciamento do gene responsável pela expressão da PpcA. Ao silenciar este gene verificou-se que o crescimento da bactéria mutada demorou mais tempo que a bactéria de tipo selvagem (“wild-type”) a crescer na presença de metais como aceptadores de electrões. Sabendo então que a redução de metais como Cr(VI), Fe(III) e U(VI) é efectuada no exterior da célula e que a PpcA é uma proteína periplasmática, pode-se concluir que esta proteína é de elevada importância no mecanismo de transferência electrónica para o exterior da célula, sendo um dos principais agentes de transferência de electrões para as redutases associadas à membrana externa as quais irão reduzir os metais³⁶. Esta conclusão baseou-se no tempo de espera observado até a redução dos metais ter início nas bactérias mutadas. Provavelmente, durante o tempo em que não ocorreu redução de metais a bactéria desenvolveu mecanismos alternativos de modo a contornar a ausência da PpcA, para promover, não só, o transporte electrónico necessário para induzir gradientes de potencial necessários para a síntese de ATP, e consequente crescimento da cultura bacteriana, mas também para a redução de metais como o Cr(VI)^{36,41}.

Assim, a PpcA apesar de não ser o redutor primário de metais como o Cr(VI), Fe(III) e U(VI)⁴², na bactéria *Geobacter sulfurreducens*, o seu papel na biorremediação é de grande importância^{36,40}.

1.2.3 Sobreexpressão da PpcA

A expressão da PpcA em laboratório apresenta alguns problemas devido às grandes dificuldades de manutenção da cultura de *Geobacter sulfurreducens* em condições anaeróbias. Foi então desenvolvido um método de modo a facilitar a expressão desta proteína através da expressão do gene da PpcA em *E. coli*, cujo crescimento é feito em condições aeróbias^{38,39}. Para obtenção do sistema de expressão recombinante recorreu-se a uma cultura de *E. coli* transformada com os plasmídeos pEC86 e pCK32, o primeiro contém o gene responsável pela maturação dos hemos dos citocromos *c* no espaço periplasmático enquanto o segundo contém o operão *lac* e o gene responsável pela expressão da PpcA^{38,39}.

1.2.4 Purificação da PpcA

A purificação da PpcA é efectuada tirando partido das suas características, nomeadamente do elevado ponto isoeléctrico e baixo peso molecular. Deste modo a

purificação baseia-se em dois tipos de cromatografia, a de permuta iónica e a de exclusão molecular.

A cromatografia de permuta iónica é um processo que permite a separação de iões e moléculas polares com base na sua carga⁴³. Esta técnica é normalmente utilizada na separação de moléculas carregadas como proteínas, nucleótidos e aminoácidos. Consiste numa troca reversível de iões ou moléculas carregadas entre duas fases imiscíveis, a fase estacionária (resina de permuta iónica) e a fase móvel (solução contendo iões ou moléculas carregadas). A resina de permuta iónica pode ser uma resina de permuta catiónica (resina que atrai e permuta catiões) ou uma resina de permuta aniónica (resina que atrai e permuta aniões). No início do processo, uma solução contendo a molécula a separar a um valor de pH e força iónica que permita a sua ligação é injectada na coluna. Este tipo de cromatografia é realizada utilizando uma solução tampão com pH e força iónica determinada de modo a que o analito presente na amostra fique retido na coluna, utilizando o tipo de resina apropriado, ao passar por esta. A eluição pode ser feita por alteração do pH ou aumento da força iónica do eluente. A alteração do pH não é normalmente utilizada quando se pretendem separar amostras biológicas pois estas tendem a desnaturar a valores de pH extremos. O aumento da força iónica por gradiente irá introduzir no sistema grupos carregados que irão competir com a molécula de interesse pela interacção com a resina de permuta iónica, resultando na sua eluição (Figura 1.2).

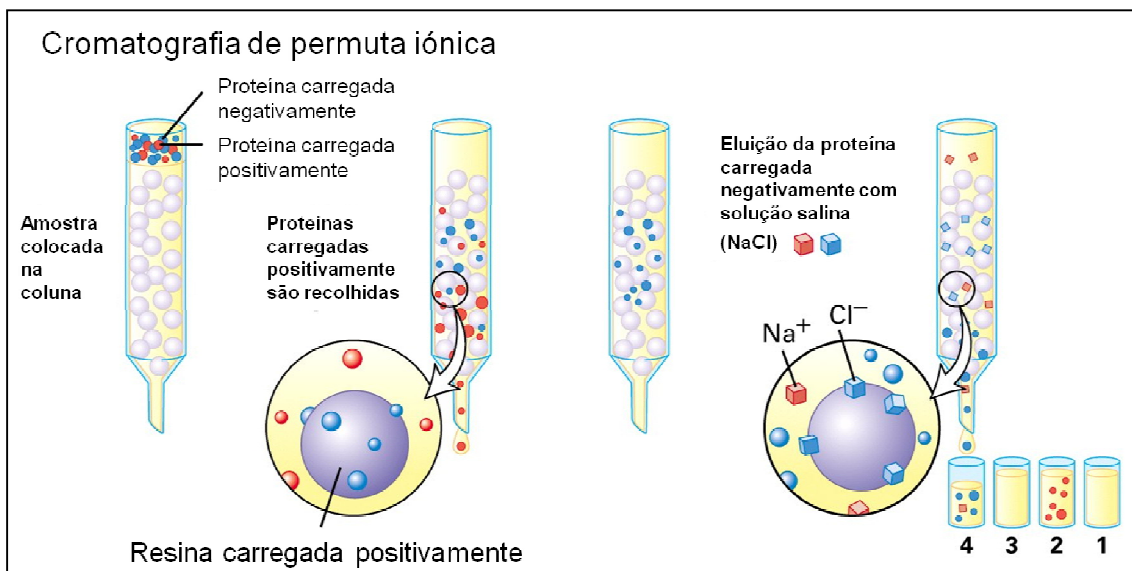


Fig. 1.2 – Esquema ilustrativo do processo de cromatografia de permuta iónica⁴³.

A cromatografia de exclusão molecular é um processo que permite a separação das moléculas com base no seu tamanho⁴³. Quando utilizada para a separação de biomoléculas consiste na utilização de uma matriz hidrofóbica como fase estacionária e uma fase móvel de soluções aquosas. A fase estacionária consiste num gel, uma estrutura tridimensional aberta

formada por ligações cruzadas de cadeias poliméricas. A extensão destas ligações cruzadas é que irá definir o limite de exclusão, o tamanho necessário da molécula para que penetre no gel. A composição da fase móvel não influencia directamente a resolução pois a separação depende exclusivamente do tamanho das diferentes moléculas. Ao longo da coluna os poros do gel são todos idênticos no entanto, na amostra existem moléculas de tamanhos diferentes. As moléculas maiores, cujo tamanho ultrapassa os limites de exclusão do gel, não conseguirão penetrar no gel e como tal serão arrastados pela fase móvel sendo eluídas primeiro que as de menor tamanho. As moléculas com um tamanho intermédio, dentro do limite de exclusão do gel, conseguem penetrar no gel e como tal irão passar pela maioria dos poros. As moléculas mais pequenas que o limite de exclusão irão penetrar no gel e por todos os poros existentes na matriz ficando muito mais tempo retidas na coluna (Figura 1.3).

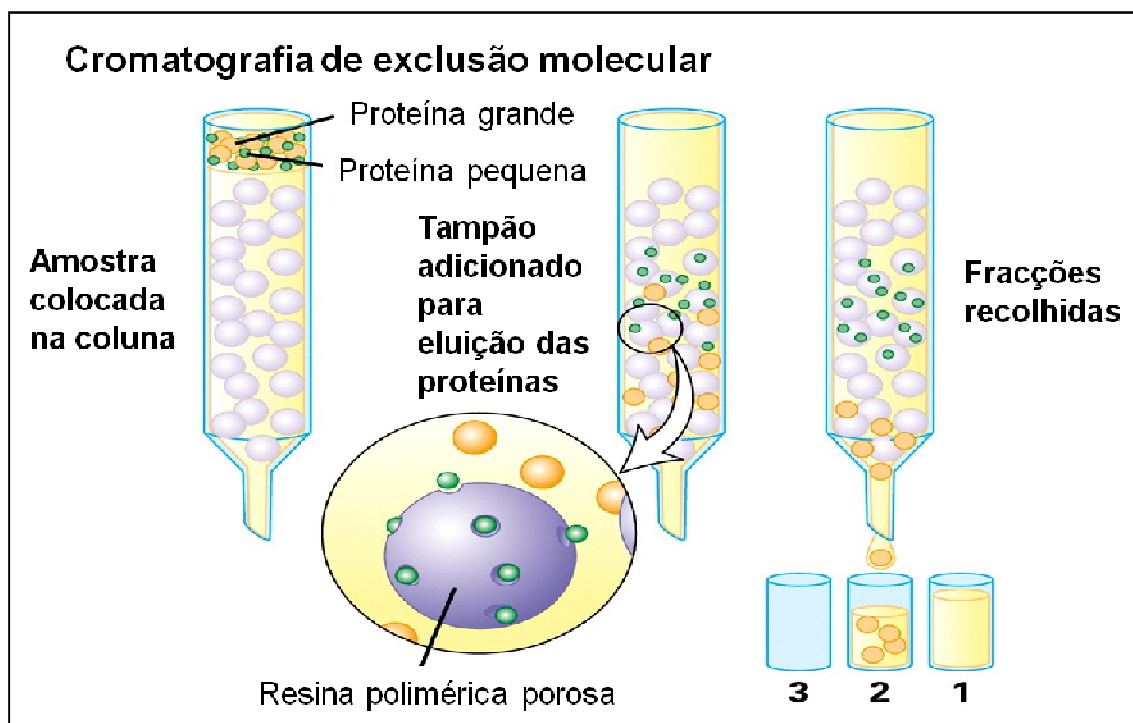


Fig. 1.3 – Esquema ilustrativo do processo de cromatografia de exclusão molecular⁴³.

1.2.5 Espectroscopia de UV/Visível da PpcA

A proteína PpcA é um citocromo do tipo *c* apresentando, por conseguinte, um espectro UV/Visível idêntico ao de outros citocromos do mesmo tipo. Na figura 1.4 está apresentado um espectro de um citocromo do tipo *c*, FerA, existente na membrana de *Geobacter sulfurreducens*⁴⁴.

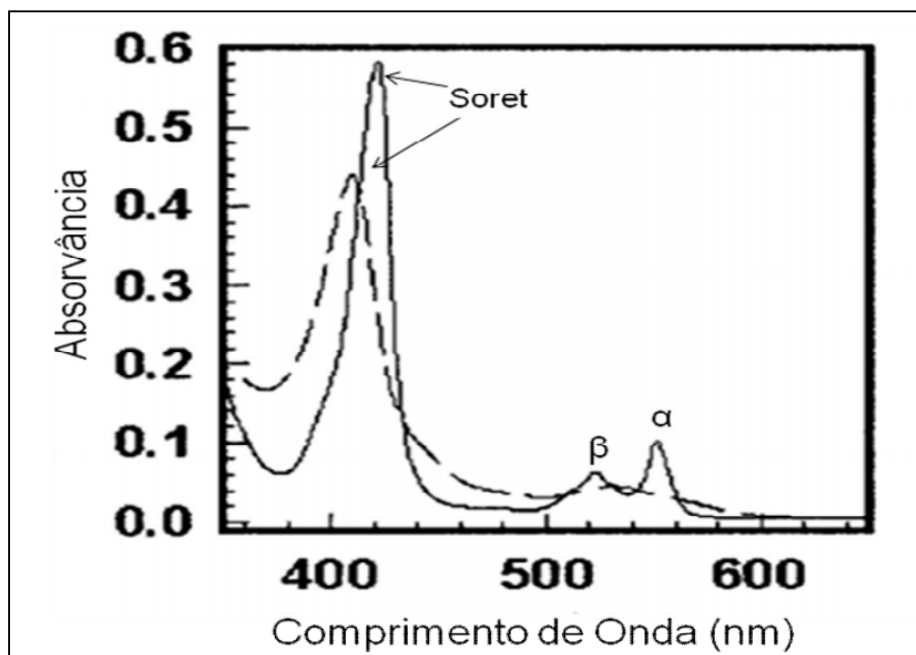


Fig. 1.4 – Espectro UV/Visível de um citocromo *c* FerA na forma oxidada (linha a tracejado) e na forma reduzida (linha contínua), espectro adaptado de *Magnuson et al.*⁴⁴.

Como se pode observar pela figura 1.4 existem diferenças consideráveis, no espectro de UV/Visível dos citocromos *c*, entre a forma oxidada e a forma reduzida. Nestes espectros podem-se visualizar as bandas características dos espectros: a banda de Soret e as bandas Q^{38,39,44}. Na forma oxidada o espectro apresenta uma banda intensa a 408 nm, correspondendo à banda de Soret e uma banda muito alargada entre 500 e 570 nm, na região das bandas Q. Na forma reduzida, a banda de Soret sofre um ligeiro desvio para 417 nm e a banda alargada desdobra-se em duas bandas, as bandas Q, definidas a 522 nm e a 552 nm e também denominadas banda β e banda α , respectivamente^{38,39,44}. Os grupos hemo são os componentes da proteína que contribuem para o espectro UV/Visível do citocromo *c*, sendo que o espectro deste tipo que é apresentado na figura 1.4, é característico de grupos hemo coordenados com imidazole⁴⁵, que é uma molécula muito semelhante à cadeia lateral da histidina, ligando axial dos hemos na PpcA³⁶ (Figura 1.5).

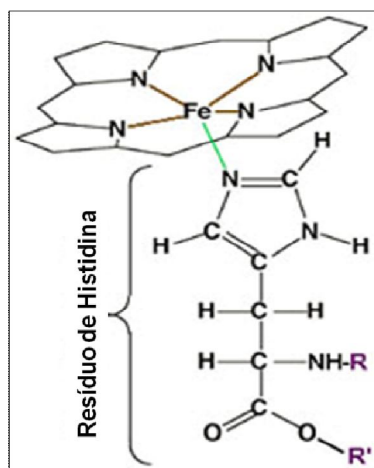


Fig. 1.5 – Representação esquemática de um grupo hemo coordenado axialmente com um resíduo de histidina⁴⁶.

1.2.6 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de proteínas permite obter informação da estrutura e da dinâmica de proteínas⁴⁷.

De uma forma muito resumida, este tipo de informação é obtida a partir de experiências de RMN multidimensionais que permitem atribuir os sinais de cada aminoácido e co-factores da proteína de interesse. Idealmente, cada núcleo na molécula sente um ambiente químico distinto e, por conseguinte, apresenta desvios químicos diferentes. No entanto em moléculas de maior dimensão, como proteínas, o número de ressonâncias atinge, tipicamente, os vários milhares e, como tal, o espectro unidimensional conterá inevitavelmente sobreposições dos sinais⁴⁸. Assim, experiências multidimensionais homonucleares (por exemplo protão-protão) e heteronucleares (por exemplo protão-azoto) aumentam significativamente a resolução dos espectros e a concomitante sobreposição dos sinais^{48,49}.

Tipicamente a primeira experiência a ser realizada com proteínas isotopicamente marcadas é um espectro 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC (coerência heteronuclear quântica única). Todos os resíduos de proteína, exceptuando a prolina, possuem um protão ligado a um átomo de azoto na ligação peptídica. Se a proteína apresentar uma estrutura tridimensional nativa os sinais da correlação destes dois núcleos (^1H e ^{15}N) estarão bem definidos e dispersos^{47,48}. O número de sinais indica, normalmente, o número de resíduos da proteína apesar de algumas cadeias laterais contendo protões ligados a azoto poderem aumentar o número de sinais observados neste tipo de experiência, como é o caso dos aminoácidos asparagina e glutamina. Este tipo de espectro é normalmente referido como a impressão digital da proteína pois cada proteína possui um padrão único das posições dos sinais ^1H e ^{15}N ^{47,48}.

O espectro 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC é também bastante útil na detecção de interações da proteína com ligandos. Por comparação do espectro da proteína livre com o da proteína na

presença do ligando, é possível identificar diferenças nos desvios químicos dos sinais envolvidos na interação⁴⁸.

1.3 Bionanotecnologia

1.3.1 Conceitos gerais

A Nanotecnologia é uma ciência que estuda as aplicações tecnológicas de materiais à escala nanométrica⁵⁰ e corresponde a uma área de interface entre vários ramos da ciência.

A Bionanotecnologia surge como a área de interface entre a Nanotecnologia e a Biotecnologia⁵⁰. A base da bionanotecnologia está na conjugação entre os materiais usados na nanotecnologia, como por exemplo as nanopartículas metálicas, com biomoléculas (por exemplo, ácidos nucleicos, proteínas, anticorpos).

1.3.2 Nanopartículas

Em Nanotecnologia uma nanopartícula é definida como uma partícula de tamanho entre 1 e 100 nanómetros que se comporta como uma unidade em termos de movimento e das suas propriedades. As nanopartículas de um material tendem a apresentar propriedades distintas daquelas que o mesmo material apresenta na forma “bulk”⁵¹. As nanopartículas são estruturas intermédias entre os materiais e as estruturas atómicas ou moleculares. Um material “bulk” tem propriedades físicas constantes e independentes do tamanho do material, no entanto à escala nanométrica são observadas propriedades dependentes do tamanho. Isto acontece devido ao aumento da contribuição de átomos à superfície e consequente aumento da área superficial, das nanopartículas, comparativamente aos materiais “bulk”^{51,52}.

Existem vários tipos de nanopartículas, que apresentam propriedades únicas de elevado interesse, como nanotubos de carbono, pontos quânticos (“quantum dots”) e nanopartículas metálicas.

1.3.3 Nanopartículas Metálicas: Ressonância Plasmónica de Superfície

As propriedades físico-químicas de um material são determinadas pelo tipo de movimento que os electrões estão permitidos a realizar⁵³. Este movimento é determinado pelo espaço em que os electrões estão confinados devido às forças que encontram. Electrões que estão livres, não confinados, têm um movimento não quantizado e pode absorver qualquer quantidade de energia⁵³. Assim, quando um electrão está confinado num átomo ou numa molécula, o seu movimento torna-se altamente confinado e quantizado. Os tipos de movimento

permitidos a um electrão quando confinados em orbitais atómicas ou moleculares possuem energias bem definidas⁵³.

Em metais, os electrões estão altamente deslocalizados no espaço, estão menos confinados, devido ao desaparecimento da separação entre as bandas de condução e as bandas de valência, dando assim ao metal as suas propriedades condutoras⁵³. Quando um campo electromagnético incide sobre um material condutor existem modos de oscilação compreendidos entre o acoplamento do campo electromagnético com os electrões condutores, denominados de plasmões de superfície⁵⁴ que se caracterizam por um forte aumento do campo na interface enquanto o vector do campo eléctrico decai exponencialmente para longe da superfície⁵⁴. Quando as dimensões do condutor diminuem, os efeitos de limite e de superfície tornam-se muito importantes e por esta razão as propriedades ópticas de nanopartículas metálicas são dominadas por uma intensa oscilação colectiva de electrões condutores em ressonância com o campo electromagnético incidente, a ressonância plasmónica de superfície^{54,55}. A formação desta ressonância plasmónica de superfície dá-se através do campo eléctrico da radiação incidente que irá induzir a formação de um dipolo na nanopartícula e existe uma força restauradora que o tenta compensar de modo a que apenas uma única frequência de ressonância corresponda a esta oscilação colectiva de electrões dentro da nanopartícula⁵⁴. O dipolo é induzido e oscila em fase com o campo eléctrico da luz incidente (Figura 1.6). Em nanopartículas de metais nobres a frequência da plasmónica situa-se na zona do visível do espectro levando a uma forte absorção nesta zona e provocando assim uma intensa coloração nas suspensões coloidais destas nanopartículas metálicas^{53,54}.

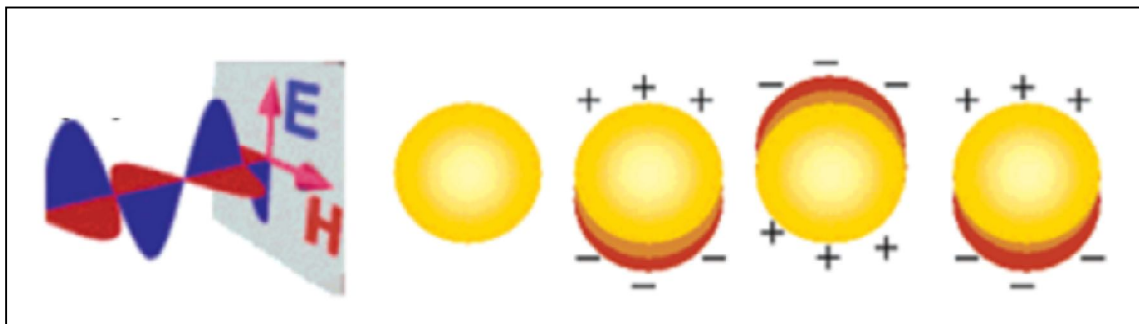


Fig. 1.6 – Esquema representativo da interacção de radiação electromagnética com uma nanoesfera metálica⁵⁴.

A posição e a forma da banda plasmónica de superfície no espectro UV/Visível dependem de factores como o tamanho e forma da nanopartícula, interacções entre nanopartículas e do índice de refração do meio⁵⁴⁻⁵⁸.

O tamanho da nanopartícula influencia maioritariamente a posição da banda plasmónica de superfície. Em nanopartículas de pequenas dimensões a oscilação colectiva dos electrões é altamente energética e como tal a banda plasmónica situa-se em comprimentos de onda menores que nanopartículas de grandes dimensões que pela razão contrária, isto é a

oscilação colectiva dos electrões é menos energética e como tal a banda situa-se a comprimentos de onda elevados^{54,56}.

A forma da nanopartícula, tal como o tamanho, influencia maioritariamente a posição da banda plasmónica de superfície, no entanto pequenas variações da forma das nanopartículas (normalmente determinadas pela proporção entre largura e altura) levam a grandes desvios na plasmónica. Quanto maior a proporção entre largura e altura mais desviado para comprimentos de onda maiores estará a banda da plasmónica devido à menor energia na oscilação colectiva dos electrões^{54,56,58}.

A interacção entre nanopartículas é, provavelmente, o factor que mais influência tem sobre a banda da plasmónica. Quanto menor a distância entre nanopartículas na suspensão, a banda da plasmónica vai sofrendo desvios para comprimentos de onda maiores e também a banda fica completamente alargada. As nanopartículas quando a sua separação é muito pequena comportam-se como nanopartículas de grandes dimensões e devido às interacções dipolo-dipolo das nanopartículas contíguas, estas deixam de se comportar como nanopartículas mas sim como um filme de metal contínuo, acabando por perder a absorção no espectro de visível⁵⁴.

O índice de refacção do meio também altera ligeiramente a banda da plasmónica de superfície devido às interacções com a superfície da partícula. A banda da plasmónica sofre um ligeiro aumento de intensidade e um desvio de poucos nanómetros quando o índice de refacção aumenta^{55,56,59}.

1.3.4 Nanopartículas de Ouro: Métodos de Síntese

As nanopartículas de ouro (AuNP) são nanopartículas esféricas, de ouro, estáveis numa solução coloidal. Os métodos de síntese de AuNP são geralmente realizados em líquidos e têm como base a redução de ácido cloroaúrico (HAuCl_4), que actua como fonte de ouro, sendo o Au^{3+} reduzido para uma forma metálica, Au^0 .

Existem diferentes métodos de síntese de AuNP que podem diferir no agente redutor, tipo de solvente utilizado e no tamanho final das AuNP⁶⁰⁻⁶³.

O método de *Brust*⁶³ gera partículas com uma dispersão de tamanhos muito reduzida, diâmetro entre 5-6 nm e tem como base a redução de HAuCl_4 com borohidreto de sódio (NaBH_4) em tolueno e brometo de tetraoctilamónio como agente de revestimento. A grande desvantagem deste método é o facto de usar um solvente orgânico como o tolueno que além de ser prejudicial para o ambiente e para o utilizador⁶⁴ também não é aplicável para a utilização com biomoléculas e como tal as AuNP têm de ser extraídas do solvente orgânico para um meio aquoso.

O método mais simples e geralmente mais utilizado é o método de *Turkevich*⁶⁰, que consiste na redução de HAuCl_4 em água, que gera AuNP com diâmetro entre 10-20 nm⁶⁰. O

agente redutor utilizado neste método é o citrato de sódio que além de efectivamente reduzir o HAuCl_4 , vai agir também como agente de revestimento das AuNP de modo a estabilizar a solução coloidal.

Os métodos de síntese de *Perrault*⁶² e *Martin*⁶¹ são efectuados em água e a redução de HAuCl_4 é efectuada utilizando hidroquinonas ou NaBH_4 , respectivamente. A diferença na utilização destes dois agentes redutores é o diâmetro que as AuNP sintetizadas irão apresentar. O método de *Perrault* é geralmente utilizado para a síntese de AuNP de grandes dimensões, entre 50-200 nm de diâmetro enquanto o método de *Martin* é utilizado para sintetizar AuNP muito pequenas, entre 3,2-5,2 nm de diâmetro.

As soluções de AuNP com cerca de 20 nm de diâmetro apresentam uma intensa coloração vermelha devido à banda plasmónica de superfície estar situada na região do espectro de visível perto de comprimento de onda de 520 nm⁵⁵ (Figura 1.7).

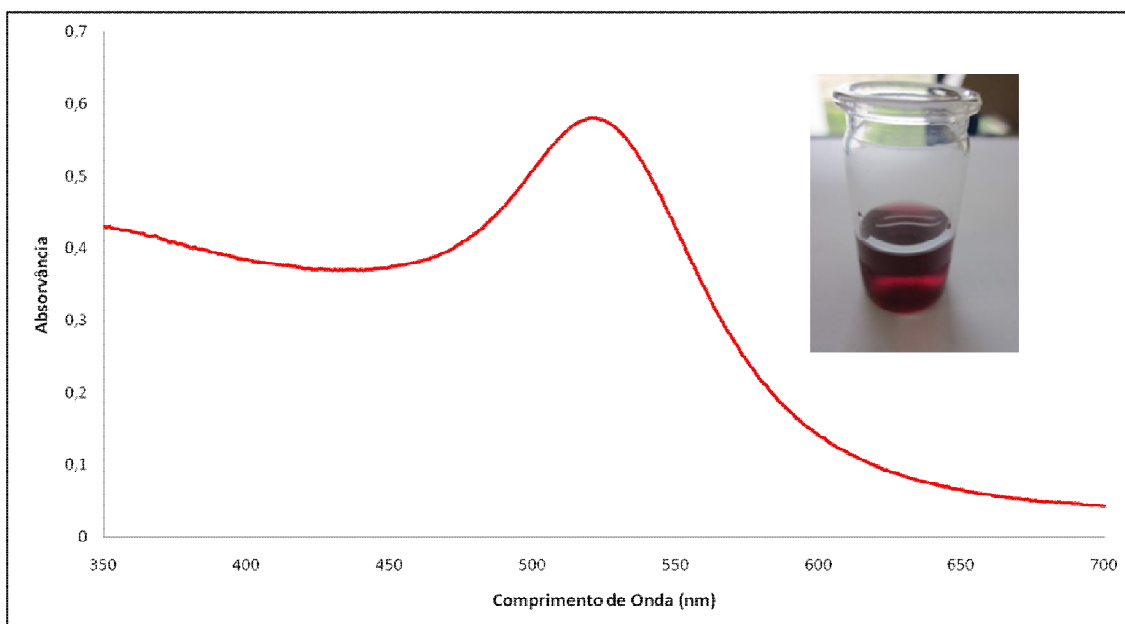


Fig. 1.7 – Espectro de UV/Visível de uma solução de AuNP. Fotografia de uma solução de AuNP.

1.3.5 Determinação da concentração da solução de AuNP

A concentração e o diâmetro das AuNP podem ser determinados através de espectroscopia de UV/Visível. O método desenvolvido por *Haiss et al.*⁶⁵ consiste em calcular estes dois parâmetros a partir do espectro UV/Visível das AuNP, calculando a razão entre a absorvância do máximo da banda da plasmónica e a absorvância a 450 nm é possível determinar o diâmetro da nanopartícula e a sua concentração através de rectas de calibração. Cada diâmetro de AuNP estudado neste método tem uma razão de Abs Plasmónica / Abs 450nm respectivo e constante e como tal a partir desta razão é possível determinar o diâmetro

das AuNP. O comprimento de onda de 450 nm é importante pois a absorvância não é influenciada por efeitos de dispersão de luz provocada por agregados de nanopartículas e tem um valor de coeficiente de extinção molar definido para cada um dos valores de diâmetro estudados neste método⁶⁵. Assim, após a determinação do diâmetro é possível calcular a concentração a partir do valor de absorvância a 450 nm e do coeficiente de extinção molar respectivo para o diâmetro determinado.

1.3.6 Estabilidade das AuNP

A solução de AuNP é uma solução coloidal sendo uma solução em que partículas numa determinada fase física, neste caso sólida, estão perfeitamente estáveis numa solução de uma fase física distinta, neste caso líquida. As AuNPs encontram-se dispersas no meio líquido devido às interações electrostáticas repulsivas entre as nanopartículas, provocadas pelo agente de revestimento. As AuNP sintetizadas pelo método de redução com citrato estão revestidas por esta moléculas que confere carga negativa à superfície das AuNP havendo assim a repulsão necessária à estabilização das nanopartículas.

A estabilidade coloidal de uma solução de nanopartículas pode ser alterada pelo aumento da força iónica e pela alteração do pH do meio. O aumento da força iónica do meio leva ao aumento da quantidade de iões que irão competir, com as AuNP, pelas moléculas de água responsáveis pela solvatação destas. Ao diminuir a solvatação das AuNP as cargas negativas à superfície destas ficam disponíveis para serem canceladas por parte dos catiões adicionados à solução, para aumentar a força iónica, fazendo com que as nanopartículas se aproximem e agreguem entre si tornando a solução polidispersa. Como já foi referido anteriormente a banda da plasmónica depende das interações entre nanopartículas, assim estas ao estarem agregadas e muito próximas umas das outras vão fazer com que a banda da plasmónica sofra um grande alargamento e se desloque para comprimentos de onda maiores, tomando assim a solução de AuNPs uma coloração azul (no caso de AuNPs com cerca de 20 nm de diâmetro - Figura 1.8). Este tipo de agregação das nanopartículas pode também ser induzida pela alteração do pH do meio para valores inferiores ao pKa do agente de revestimento. Ao atingir o valor do pKa do agente de revestimento, este é protonado e como tal deixa de conferir a carga negativa à superfície das AuNP responsável pela estabilização da solução. Assim, as nanopartículas deixam de apresentar as forças repulsivas necessárias para se manterem afastadas em solução e tendem a agregar tal como acontece com o aumento da força iónica.

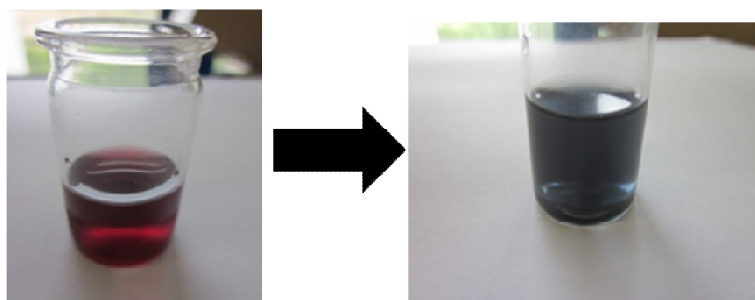
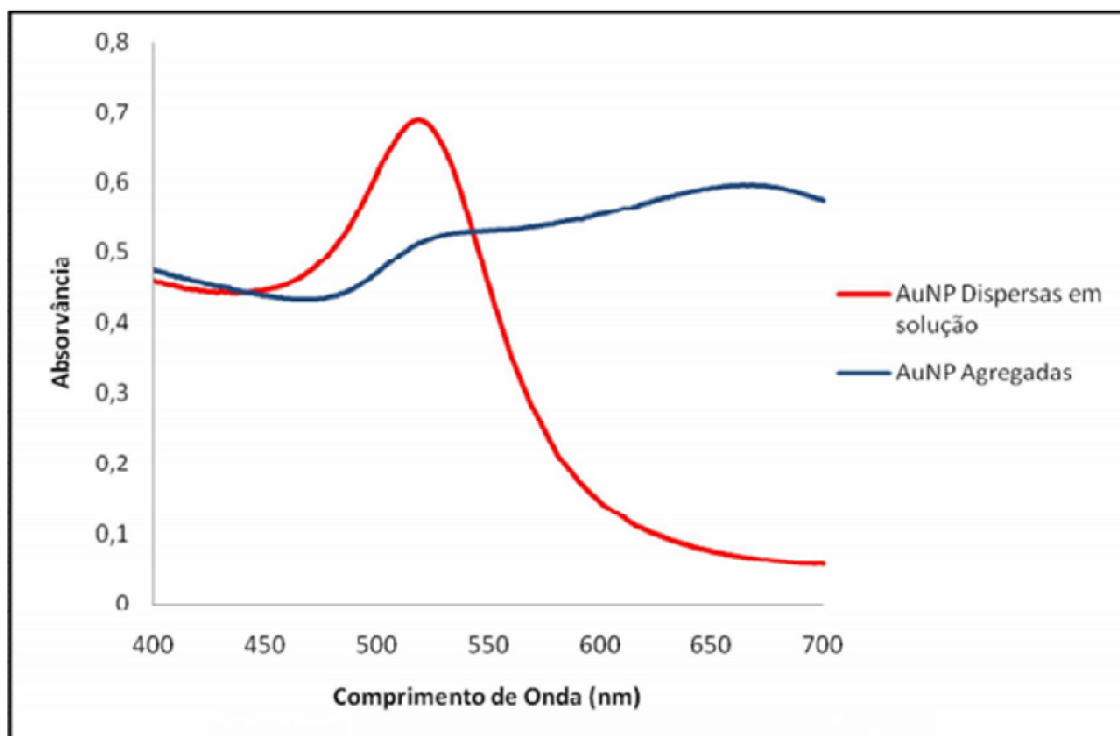


Fig. 1.8 – Espectros de UV/Visível de soluções de AuNP não agregada (linha vermelha) e agregada (linha azul). Fotografias de uma solução de AuNP estável (esquerda) e agregada (direita).

1.3.7 Funcionalização e Aplicações Biotecnológicas das AuNP

As AuNP para poderem estar estabilizadas numa solução têm que possuir um agente de revestimento para haver a necessária repulsão entre nanopartículas. No entanto o agente de revestimento não tem que necessariamente ser aquele que é conferido durante a síntese das AuNP. O citrato é um agente de revestimento muito lábil e facilmente substituído por outros agentes de revestimento que poderão ser vários, dependendo da aplicação das AuNP^{55,66}.

A funcionalização das nanopartículas é feita tendo em conta a grande afinidade dos grupos sulfidrido para o ouro^{67,68}. Assim, a maioria dos agentes de revestimento para aplicações biotecnológicas são moléculas tioladas de forma a garantir uma ligação muito forte entre o agente de revestimento e as AuNP^{55,67}.

Um dos agentes de revestimento muito utilizados para aplicações biotecnológicas das AuNP são oligonucleótidos tiolados, cujo grupo sulfidrilo irá ligar-se covalentemente às AuNP deixando à superfície destas uma carga uniforme negativa, mantendo a solução estável e mono dispersa. Este tipo de funcionalização tem um grande potencial de utilização em detecção clínica^{69,70}, nomeadamente na detecção de sequências específicas complementares ao agente de revestimento para detecção de doenças⁷⁰ e expressão eucariótica de genes⁷¹, através da alteração da banda da plasmónica ou por testes colorimétricos pela alteração da cor da solução^{55,69-71}.

A aplicação das AuNP em métodos clínicos tem sido amplamente estudada⁶⁹ nomeadamente para a detecção, utilizando anticorpos conjugados com AuNP otimizados para a detecção de antígenos, responsáveis por doenças infecciosas, em amostras de sangue do paciente^{72,73}. Outra aplicação em métodos clínicos tem sido a libertação de moléculas controlada⁷⁴⁻⁷⁶ no local específico que está afectado, deste modo aumentando a eficiência do tratamento e diminuindo os problemas de toxicidade de certos fármacos e medicamentos.

A utilização de proteínas conjugadas directamente com AuNP também tem sido alvo de intenso estudo^{77,78}. A interacção entre a AuNP e a proteína dá-se electrostaticamente ou pela ligação covalente entre o grupo sulfidrilo das cisteínas presentes na proteína^{79,80}. No entanto, este tipo de ligações entre proteína e AuNP não é muito favorável pois uma ligação covalente pode criar tensão na estrutura da proteína levando à desnaturação, alterações conformacionais ou perda da actividade desta^{77,80-83}. Assim foram estudadas moléculas que actuassem como agentes de revestimento e ligando intermédios entre as AuNP e as proteínas⁶⁷. Das moléculas estudadas para actuarem desta forma, destacam-se os pequenos péptidos e os alcanotióis. Os pequenos péptidos⁸⁴ podem ser uma sequência peptídica curta (cerca de 5 aminoácidos, por exemplo), em que o resíduo que faz a ligação com a AuNP é uma cisteína, devido à afinidade dos grupos sulfidrilo. A cisteína é tipicamente seguida por uma alanina e uma leucina que ao possuírem cadeias laterais hidrofóbicas irão permitir a auto-montagem dos péptidos na superfície das AuNP através de interacções hidrofóbicas intermoleculares⁸⁴. O resíduo na extremidade oposta à AuNP é um resíduo carregado de forma a garantir tanto a estabilidade das nanopartículas em solução, como a interacção com outras biomoléculas⁸⁴. Dos alcanotióis destaca-se o ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), que é uma molécula muito utilizada em técnicas de conjugação de AuNP com proteínas⁶⁷, o grupo sulfidrilo, numa das extremidades da molécula, liga-se covalentemente às AuNP e o grupo carboxílico, na outra extremidade, fica virado para a solução (Figura 1.9), conferindo uma carga negativa uniforme à superfície das nanopartículas e possibilitando interacções electrostáticas com as biomoléculas⁶⁷.

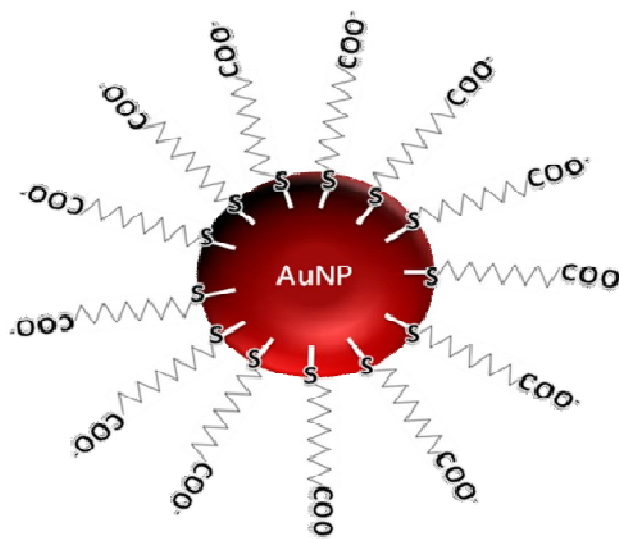


Fig. 1.9 – Esquema representativo de uma nanopartícula de ouro funcionalizada com ácido 11-mercaptopundecanóico.

As AuNP conjugadas com proteínas (bionanoconjugados) têm sido amplamente estudadas, nomeadamente em termos da interacção da proteína com a nanopartícula ou como potencial utilização do conjugado em aplicações biotecnológicas, nomeadamente em biosensores. A interacção proteína-nanopartícula^{77,78} tem sido intensamente estudada de modo a determinar e compreender o mecanismo de interacção^{80,82,83,85,86} para possibilitar o controlo da conjugação, nomeadamente da face da proteína que interage directamente com as AuNP^{67,87}. Os bionanoconjugados são alvos de diferentes estudos para determinar a sua estabilidade a diversos factores, como temperatura⁸⁸ e pH^{82,89}. Estes estudos de estabilidade são importantes para a utilização destes bionanoconjugados para detecção de contaminantes^{90,91}, em ambientes naturais.

A utilização de AuNP em biossensores electroquímicos tem sido alvo de grande expansão^{92,93} pelo facto de um dos grandes problemas de electroquímica de proteínas ser a comunicação entre o centro activo da enzima e a superfície do eléctrodo, devido a uma camada protectora que isola o centro activo em proteínas, como oxidoreductases, dificultando a comunicação entre proteína e eléctrodo. A superfície dos eléctrodos ao ser modificada com AuNP cria-se um microambiente semelhante ao existente nos sistemas nativos de proteínas redox, garantindo assim uma maior liberdade de orientação das moléculas proteicas, aumentando a condução e a transferência electrónica⁹⁴, aumentando assim a sensibilidade do biossensor.

1.3.8 Técnicas para avaliar Conjugação de proteínas a AuNPs

Após a formação dos bionanoconjugados é necessário provar efectivamente a conjugação entre os dois componentes. Existem várias técnicas que têm sido estudadas e

utilizadas para provar a conjugação entre proteínas e AuNP, como electroforese em géis de agarose⁹⁵. A espectroscopia de RMN também tem sido, recentemente, abordada neste contexto⁹⁶, no entanto a técnica mais utilizada é a medição de potencial zeta^{82,85,89}.

O potencial zeta está relacionado com a carga superficial da camada de hidratação das nanopartículas. Ao desenvolver-se uma rede de cargas à superfície das nanopartículas, estas irão afectar a distribuição de iões na interface, fazendo com que haja uma maior concentração de iões na superfície, formando assim uma dupla camada eléctrica, semelhante à existente nos eléctrodos⁴³. Esta dupla camada existe em duas fases, uma interior com uma grande concentração de iões à superfície da nanopartícula denominada de camada de Stern⁹⁷ e uma fase exterior, difusa onde há menos iões, denominada de camada difusa⁹⁷. Para dentro desta camada, as nanopartículas e os iões formam uma entidade estável que estabelece uma fronteira com a solução e apresentando um potencial superficial, a esse potencial denomina-se potencial zeta⁹⁷ (Figura 1.10).

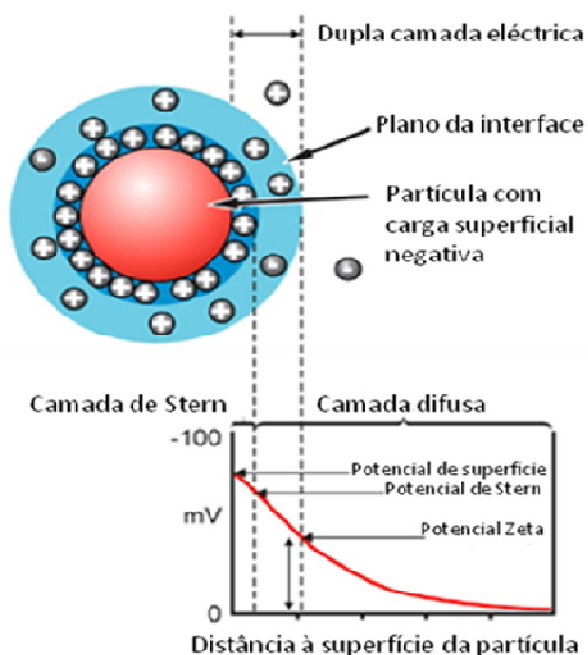


Fig. 1.10 – Representação esquemática, adaptada⁹⁷, do potencial zeta.

O potencial zeta é calculado a partir da mobilidade electroforética da amostra, pois esta é sujeita a um campo eléctrico na célula de medição. Aplicando a equação de Henry é possível calcular o potencial zeta.

$$U_E = (2\epsilon\zeta / 3\eta) f(kR) \quad (\text{Equação 1})$$

Em que U_E representa a mobilidade electroforética, ϵ representa a constante dieléctrica do meio, η representa a viscosidade do meio e $f(kR)$ representa a função de Henry que pode

tomar o valor de 1 ou de 1,5, dependendo se a amostra está em meio não aquoso ou em meio aquoso, respectivamente.

O valor de potencial zeta sofre alterações quando a superfície das AuNP é alterada, nomeadamente através da conjugação com biomoléculas. Com proteínas a interacção entre as AuNP e estas moléculas é preferencialmente electrostática e como tal as cargas à superfície da AuNP são canceladas. Assim, a superfície dos bionanoconjugados tem um potencial menos negativo do que a superfície das AuNP. Pode-se calcular a variação do potencial zeta nos bionanoconjugados à medida que a concentração da biomolécula aumenta, através duma equação adaptada da equação de isotérmicas de adsorção de Langmuir^{82,89}.

$$\Delta\zeta = (\Delta\zeta_{\text{Max}} K_L R) / (1 + K_L R) \quad (\text{Equação 2})$$

Em que $\Delta\zeta$ representa a variação do potencial zeta, $\Delta\zeta_{\text{max}}$ representa a variação de potencial zeta máxima, K_L representa a constante de ligação e R representa a razão [Biomolécula]/[AuNP].

Através da medida de potencial zeta não só é possível provar que efectivamente existe conjugação entre a biomolécula e as AuNP como também determinar qual a concentração de biomolécula que satura a superfície das AuNP de modo a não ocorrerem mais variações no potencial zeta.

1.3.9 Técnicas electroquímicas para determinação da actividade da PpcA: Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é um tipo de técnica electroquímica em que o potencial do eléctrodo de trabalho é variado linearmente em função do tempo. Nesta técnica quando se atinge o potencial definido, este é invertido de modo a serem realizados ciclos de potencial⁴³.

Esta técnica utiliza tipicamente um sistema de três eléctrodos, um eléctrodo de referência, um eléctrodo de trabalho e um eléctrodo auxiliar. O eléctrodo auxiliar tipicamente é constituído por um material condutor que não reage com a solução, pois é importante que as reacções ocorridas à superfície do eléctrodo auxiliar não interfiram com o estudo e para isso é necessário que este eléctrodo continue a conduzir eficientemente, ao longo de todo o processo de modo a manter a geração de corrente, entre este e o eléctrodo de trabalho⁴³.

Em voltametria cíclica a variação do potencial em função do tempo é denominada de velocidade de varrimento (V/s). O potencial é aplicado entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo de referência e a corrente é medida entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo auxiliar. Os dados obtidos com esta técnica são analisados através de um voltamograma onde é representada a corrente em função do potencial. Quando o potencial aplicado atinge o potencial de redução ou oxidação do analito em estudo é gerada um pico de corrente redução

ou oxidação, dependendo do sentido do potencial aplicado. Se a reacção redox do analito em estudo é reversível, quando o potencial é invertido, gera-se um pico de corrente de polaridade inversa ao pico observado anteriormente⁴³.

Para se poder utilizar voltametria cíclica, o analito terá de ser electroquimicamente activo na janela de potencial em estudo e é também desejável que o analito apresente reversibilidade no processo redox.

A reversibilidade da reacção redox pode ser determinada a partir da análise do voltamograma. A diferença de potencial entre o potencial de redução ou catódico (E_{pc}) e o potencial de oxidação ou anódico (E_{pa}) tem um valor ideal consoante número (n) de electrões transferidos na reacção (Equação 3)⁴³.

$$|E_{pc} - E_{pa}| = 59 / n \quad \text{(Equação 3)}$$

A reversibilidade também pode ser avaliada pela razão da intensidade de corrente dos picos de redução e oxidação, se a reacção for reversível a intensidade de corrente nos dois processos é igual e a razão da intensidade de corrente destes dois picos é igual a 1.

Se a reversibilidade do processo for verificada pode-se retirar informação termodinâmica da reacção electroquímica através da determinação do $E_{1/2}$ que é o potencial a meio do potencial de redução e de oxidação.

A determinação do valor de $E_{1/2}$ é também importante para comparação com valores observados na literatura para comparar a eficiência de um eléctrodo numa reacção padrão, verificando assim se o eléctrodo mantém as características de determinada reacção electroquímica.

1.3.10 Modificação de eléctrodos: Deposição de ouro e Imobilização de Biomoléculas

Os eléctrodos de trabalho em técnicas de voltametria cíclica são geralmente constituídos por materiais bons condutores, como carbono vítreo, platina ou ouro. No entanto também é possível utilizar um eléctrodo constituído por vidro condutor. Estes eléctrodos, no entanto, apresentam de uma forma geral maior resistência à condução eléctrica do que os materiais anteriormente mencionados. Os eléctrodos de vidro são muito utilizados como eléctrodos de trabalho ou suporte para células fotovoltaicas e mesmo nestes sistemas, os eléctrodos de vidro apresentam uma resistências de algumas centenas de ohm.

Existem algumas estratégias para minimizar este problema, nomeadamente a deposição de polímeros condutores à superfície de vidro, dopagem com metais ou iões, além da deposição de metais, entre outras⁹⁸. A deposição de ouro, formando nanoestruturas metálicas, sobre um eléctrodo de vidro condutor, como óxido de estanho dopado com fluoreto (FTO), é uma aplicação nanotecnológica bastante interessante, não só pelo aumento da

condutividade mas também devido à possibilidade de criar um material capaz de gerar o efeito que se utiliza em Espectroscopia de Raman Aumentada pela Superfície (“SERS”)⁹⁹.

Após a modificação de eléctrodos de vidro de modo a aumentar a condutividade do eléctrodo, é possível também modificar a superfície do eléctrodo com biomoléculas, nomeadamente proteínas. A modificação do eléctrodo através da imobilização da biomolécula à superfície deste faz com que seja possível obter um sinal electroquímico satisfatório, da biomolécula, utilizando pequenas quantidades desta.

Existem diferentes estratégias para a imobilização de biomoléculas em eléctrodos ou superfícies metálicas podem ser diversas:

- Imobilização por adsorção, neste caso a superfície metálica e a biomolécula de interesse são colocadas em contacto esperando que ocorra interacção entre ambas e formação de uma ligação química ou electrostática;
- Imobilização por membranas¹⁰⁰, neste caso a biomolécula é previamente concentrada e através de membranas, impermeáveis à biomolécula, é possível prendê-la à superfície do eléctrodo;
- Imobilização química através de agentes de ligação¹⁰¹, neste caso através da utilização de agentes químicos as moléculas ligam-se indirectamente à superfície metálica do eléctrodo.

1.4 Abordagem bionanotecnológica para biorremediação de cromato

A partir dos conceitos mencionados e explicados durante este capítulo (“Introdução Teórica”), o objectivo deste trabalho consiste na formação de bionanoconjugados de AuNP e PpcA com o intuito de criar um sistema capaz de detectar e biorremediar, por redução dissimilatória, Cr(VI) na forma de ião cromato, através de uma abordagem de detecção e remediação (“*sense and shoot*”)¹⁰² (Figura 1.11).

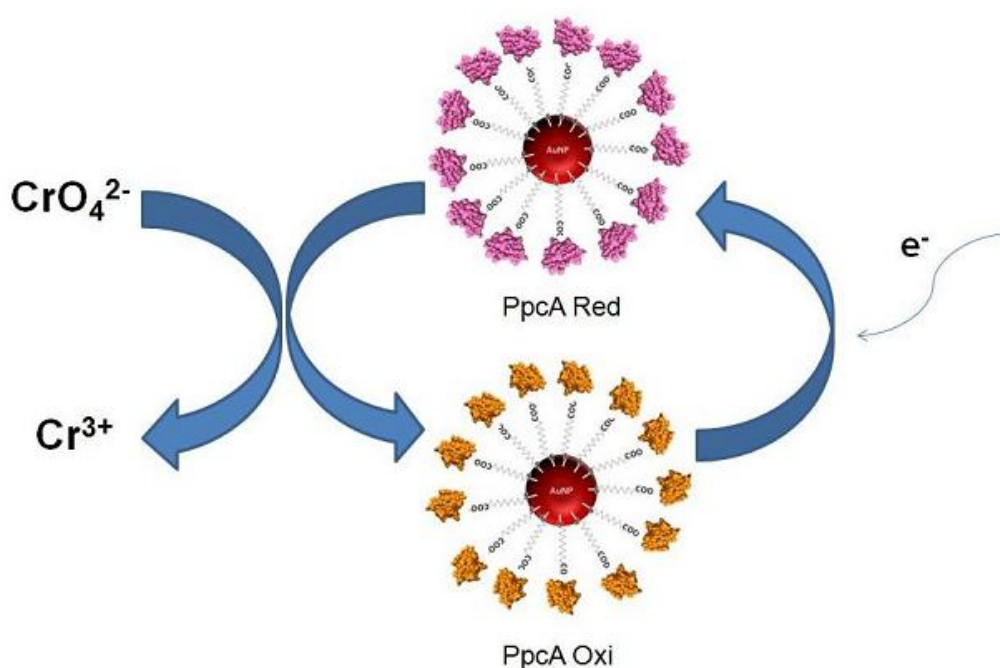


Fig. 1.11 – Esquema representativo proposto para biorremediação de Cr(VI), baseado em bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA.

Pretende-se assim formar bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA estáveis e activos num sistema electroquímico onde exista fornecimento de electrões para permitir a transferência de electrões desde a PpcA para o ião cromato. Pretende-se também compreender a formação destes bionanoconjugados de modo a determinar como é feita essa ligação e qual a quantidade de PpcA necessária para revestir totalmente as AuNP de modo a formar bionanoconjugados compactos e como tal estáveis em condições ambientais variáveis.

Capítulo II: Parte Experimental

2 Parte Experimental

2.1 Sobreexpressão e Purificação da PpcA

2.1.1 Transformação de *Escherichia coli* BL21/pEC86 com o plasmídeo pCK32

A transformação das células foi baseada no método anteriormente descrito^{38,39}. As células já competentes de *E. coli* BL21 (Novagen) contendo o plasmídeo pEC86 foram transformadas com o plasmídeo pCK32, adicionando 1 µL de pCK32 com 10 ng/µL a 50 µL de uma cultura contendo aproximadamente 10^{10} células/mL. Estas foram então incubadas em gelo durante 30 minutos e seguidamente colocadas num banho a 42°C durante 1 minuto, colocando-se de novo em gelo durante 1 minuto. Em seguida adicionou-se 500 µL de meio de cultura 2xYT (a composição deste meio está descrita no Apêndice I) às células e incubou-se a 30°C a 250 rpm durante 1 hora. Após este período as células foram plaqueadas (100 µL por placa) com meio 2xYT+CLO (34 µg/mL) + AMP (100 µg/mL) e incubadas a 37°C durante a noite.

2.1.2 Crescimento da cultura de transformantes e expressão de PpcA recombinante

Após a incubação, foram seleccionados colónias isoladas tendo-se inoculado duas em cada um de 2 erlenmeyers contendo 50 mL de meio 2xYT+CLO (34 µg/mL) + AMP (100 µg/mL). As novas culturas foram incubadas a 30°C a 200 rpm durante a noite. Em seguida inocularam-se 2 erlenmeyers com 1 L de meio 2xYT+CLO (34 µg/mL) + AMP (100 µg/mL) com 10 mL de inóculo em cada um e incubaram-se as culturas a 30°C a 150 rpm. Adicionaram-se 60 µL de IPTG 40 mg/mL a cada erlenmeyer 10 horas após a inoculação e colocou-se novamente as culturas a incubar a 30°C, 200 rpm durante a noite.

2.1.3 Isolamento da fracção periplasmática da cultura de *Escherichia coli* BL21/pEC86

O conteúdo dos erlenmeyers foi distribuído por tubos de centrifuga pré-arrefecidos e foram centrifugados a 2800 x g numa centrifuga 5804 R da Eppendorf, durante 15 minutos a 4°C. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em tampão de lise (30 mL de tampão por litro de cultura, a composição deste tampão está descrita no Apêndice I) com 0,5 mg/mL de lisozima e deixou-se à temperatura ambiente durante 25 minutos.

Dividiu-se então o volume da solução por tubos de centrifuga adicionando igual volume de água gelada a cada um. Incubaram-se os tubos em gelo com leve agitação durante 15 minutos e centrifugou-se a 14000 x g durante 20 minutos a 4°C.

2.1.4 Purificação e doseamento de PpcA recombinante

As amostras foram ultracentrifugadas, numa ultracentrífuga Optima LE-80K da Beckman Coulter, a 225000 x g durante 1h30 a 4°C. A fracção periplasmática foi dialisada numa fita de diálise Spectra/Pro Dialysis Membrane com limite de exclusão de 3 kDa, contra tampão Tris/HCl 10 mM pH 8,5. De seguida concentrou-se a amostra para um volume de 100 mL com tubos de ultrafiltração Amicon Ultra da Millipore com limite de exclusão de 5 kDa a 5000 x g.

A amostra foi centrifugada a 6797 x g durante 30 min a 4°C e posteriormente aplicado em duas colunas (5mL Econo-Pac HighS, resina catiónica), num sistema ÄKTAprime plus com detector UV a um comprimento de onda de 210 nm característico da absorção de ligações peptídicas, previamente lavadas com água milli-Q e equilibradas com tampão Tris/HCl 10 mM pH 8,5, com um caudal de 1 mL/min e lavado com tampão Tris/HCl 10 mM pH 8,5. Fez-se um gradiente de 150 mL de 0 a 300 mM NaCl em tampão Tris/HCl 10 mM pH 8,5 a 1 mL/min. As fracções recolhidas que apresentavam um quociente entre a absorvância a 408 nm e 210 nm próximo de 1 foram seleccionadas, para o passo seguinte de purificação. Estas fracções foram combinadas e concentradas para cerca de 2 mL com tubos de ultrafiltração Amicon Ultra da Millipore com limite de exclusão de 3 kDa a 5500 x g, trocando o tampão para 100 mM NaPi pH 8.

A amostra concentrada obtida anteriormente foi centrifugada a 10000 x g durante 15 minutos e seguidamente aplicada numa coluna Superdex 75 de 120 mL previamente lavada com água milli-Q e equilibrada com tampão 100 mM NaPi pH 8, com um caudal de 1 mL/min. As fracções de interesse foram escolhidas através da banda respectiva da PpcA no cromatograma e pela cor das amostras. Juntaram-se as fracções escolhidas e concentrou-se para um volume final de 2 mL.

O doseamento da amostra de PpcA foi efectuado por espectroscopia de UV/Visível (350 a 700 nm) num espectrofotómetro Cary 50 Bio da Varian considerando o valor de absorvância da banda α da forma reduzida ($\epsilon_{552\text{nm}}^{39} = 97,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A redução da amostra foi obtida pela adição de ditionito de sódio.

2.2 Síntese e Estabilidade das Nanopartículas de Ouro

2.2.1 Síntese e funcionalização das Nanopartículas de Ouro

A síntese das Nanopartículas de Ouro baseia-se no método de redução por citrato previamente descrito por *Turkevich*⁶⁰.

As Nanopartículas de Ouro foram sintetizadas pela redução de uma solução de HAuCl_4 1 mM (Aldrich 99,99%) com uma solução de citrato de sódio 1% p/v (Sigma 99,99%).

A solução de HAuCl_4 , 200 mL, foi aquecida num balão de síntese, em refluxo, até à ebulição antes de iniciar a redução com a adição de 50 mL de uma solução de citrato de sódio 1% p/v preparada de fresco. O aquecimento foi desligado 15 minutos após a coloração da solução se tornar vermelha e foi deixada a arrefecer à temperatura ambiente.

A funcionalização das Nanopartículas de Ouro com Ácido Mercapto Undecanóico (Aldrich 95%) foi feita adicionando este último a partir de uma solução etanólica de MUA 1 mM, à solução de Nanopartículas de Ouro numa proporção molar de 120:1 e deixou-se a incubar durante a noite à temperatura ambiente.

2.2.2 Estabilidade das Nanopartículas de Ouro a diferentes concentrações de NaCl

O estudo de estabilidade das AuNPs para concentrações crescentes de NaCl foi efectuado adicionando a diferentes tubos, contendo a mesma concentração de AuNP-MUA, quantidades determinadas de solução de NaCl 1M (Panreac 99,9%) para obter a força iónica pretendida. Fez-se este estudo para soluções de AuNP-MUA 3 nM e 1 nM variando a força iónica de 10 em 10 mM entre 0 e 80 mM. Em todos os casos obteve-se o espectro de UV/Visível (350 a 700 nm) num espectrofotómetro Cary 50 Bio da Varian, imediatamente após a adição de NaCl e homogeneização.

2.2.3 Estabilidade das Nanopartículas de Ouro a diferentes valores de pH

O estudo de estabilidade das AuNPs para diferentes valores de pH foi efectuado acertando o pH de diferentes tubos contendo soluções de AuNP-MUA, de concentração idêntica, adicionando pequenas quantidades de HCl 0,1 M e 0,01 M (Sigma-Aldrich 37%) e de NaOH 0,1 M e 0,01 M (Sigma-Aldrich 98%) quando se pretende acertar o pH para valores mais ácidos ou mais alcalinos, respectivamente. Fez-se este estudo para soluções de AuNP-MUA 3 nM variando o pH de aproximadamente uma unidade numa gama entre 2 e 12. Para todos os valores de pH obteve-se o espectro UV/Vis (350 a 700nm) num espectrofotómetro Cary 50 Bio da Varian, imediatamente após o acerto do pH.

2.3 Formação de Bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA

2.3.1 Preparação dos Bionanoconjugados

Os bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA foram preparados adicionando à solução de AuNP-MUA, com o pH previamente acertado a 11 com uma solução de NaOH 0,1 M (Sigma-Aldrich 98%), a quantidade adequada de PpcA para obter a solução de

bionanoconjugados de razão [PpcA]/[AuNP-MUA] desejada e deixaram-se a incubar a 4°C durante a noite.

2.3.2 Estudo da formação dos bionanoconjugados por espectroscopia de UV/Visível

Foram preparadas soluções de bionanoconjugados de 1 mL com diferentes razões [PpcA]/[AuNP-MUA] seguindo o método anteriormente descrito.

Foi então feito os espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados num espectrofotômetro Cary 50 Bio da Varian. Os espectros foram tratados com o software PeakFit v4.12 de modo a determinar a contribuição de cada um dos componentes dos bionanoconjugados no espectro total.

2.3.3 Medição do Potencial Zeta dos bionanoconjugados

Foram preparadas soluções de bionanoconjugados de 1 mL com diferentes razões [PpcA]/[AuNP-MUA] seguindo o método anteriormente descrito.

Foi então medido o Potencial Zeta das amostras a 25°C, com tempo de equilíbrio de 300 segundos, num Zetasizer Nano Series da Malvern Instruments com um laser de He-Ne de 4 mW num ângulo de dispersão fixo de 17°, com células de Zeta descartáveis (Malvern, UK) e foram feitas 3 medições com 100 repetições em cada uma das medições.

2.3.4 Electroforese dos bionanoconjugados em géis de agarose

Este estudo foi baseado no método descrito por *Hanauer et al.*⁹⁵.

Foram preparados bionanoconjugados PpcA e AuNP-MUA com as razões desejadas adicionando a 45 µL de uma solução de AuNP-MUA, a 12 nM, 1,5 µL de uma solução de PpcA cuja concentração seria a indicada para que no volume final se verifique a razão [PpcA]/[AuNP] pretendida.

Preparou-se um gel de agarose com a concentração desejada (0,5%, 1% e 2%) dissolvendo a quantidade de agarose necessária em 45 mL de TAE (composição deste tampão está descrita no Apêndice I) 1/8 X a pH 8, aquecendo a mistura numa placa de aquecimento, com agitação até à ebulição. A solução de agarose foi vertida, ainda quente, para o suporte onde irá gelificar e que contém o pente com o número de poços desejados (8 ou 15). O gel foi então deixado à temperatura ambiente até gelificar e depois foi colocado a 4°C para homogeneizar a gelificação.

Imediatamente antes da adição das amostras aos poços adicionou-se glicerol 87% (Panreac) a estas, dependendo do volume que é adicionado aos poços, 15 µL para 15 poços e

30 µL para 8 poços, a quantidade de glicerol adicionada foi cerca de 10% do volume de amostra a adicionar a cada poço.

A electroforese foi então efectuada numa tina Enduro, com campo constante de 150 V durante 30 minutos, sendo o electrólito o tampão TAE 1/8 X a pH 8.

2.3.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear dos bionanoconjugados

Prepararam-se amostras para espectroscopia de RMN dividindo 30 mL de uma solução de AuNP 3 nM em tubos de 1 mL e centrifugando numa centrífuga 5810 R, da Eppendorf, a 20817 x g durante 60 minutos a 4°C. O sobrenadante foi rejeitado de modo a que o pellet fosse ressuspensionado apenas em 10 µL e juntaram-se num só tubo os 300 µL de AuNP concentrada para cerca de 300 nM.

A amostra de PpcA com a concentração adequada para se obter a razão pretendida foi previamente acertada a pH 11 e adicionada à solução concentrada de AuNP de modo a obter um volume final de 200 µL e deixou-se a incubar durante a noite.

A solução de bionanoconjugados de PpcA e AuNP foi acertada a pH 8 com a adição de pequenos volumes de HCl 0,1 M (Sigma-Aldrich 37 %) e pipetaram-se 170 µL da amostra para um tubo de RMN de 3 mm, adicionando posteriormente 14 µL de D₂O.

Os espectros de RMN foram adquiridos a 25°C num espectrómetro Bruker Avance 600 equipado com criossonda. Os espectros unidimensionais de protão 1D-¹H foram adquiridos com uma janela espectral de 24 kHz e 1024 acumulações. Os espectros bidimensionais 2D-[¹H-¹⁵N]-HSQC foram adquiridos com uma janela espectral de 12 kHz em protão e 3 kHz em azoto, com 128 acumulações. Os desvios químicos de protão foram calibrados usando o sinal da água como referência interna e os desvios de azoto foram calibrados por referência indirecta¹⁰³.

Os espectros foram processados com o software Topspin (Bruker Biospin, Karlsruhe, Alemanha) e analisados com o programa Sparky (Goddard, T.D. e D.G. Kneller, University of California, San Francisco, EUA).

2.4 Estabilidade dos Bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA

2.4.1 Estabilidade dos bionanoconjugados a diferentes concentrações de NaCl

Foram preparadas soluções de bionanoconjugados com diferentes razões [PpcA]/[AuNP-MUA] seguindo o método anteriormente descrito.

Este estudo de estabilidade dos bionanoconjugados a diferentes concentrações de NaCl foi efectuado adicionando a diferentes tubos, contendo a mesma concentração de bionanoconjugado com a razão [PpcA]/[AuNP-MUA] pretendida, quantidades determinadas de uma solução de NaCl 4 M (Panreac 99,9%) de modo a obter na solução a força iónica

desejada. Foi feito um espectro de UV/Visível num espectrofotómetro Cary 50 Bio da Varian, imediatamente após a adição de NaCl e consequente homogeneização.

2.4.2 Estabilidade dos bionanoconjugados a diferentes valores de pH

Foram preparadas soluções de bionanoconjugados com a razão [PpcA]/[AuNP-MUA] igual a 200 seguindo o método anteriormente descrito.

Este estudo de estabilidade dos bionanoconjugados a diferentes valores de pH foi efectuado acertando o pH a diferentes tubos contendo soluções de bionanoconjugados com concentração idêntica, adicionando pequenos volumes de HCl 0,1 M e 0,01 M (Sigma-Aldrich 37%) e de NaOH 0,1 M e 0,01 M (Sigma-Aldrich 98%) quando se pretende acertar o pH para valores mais ácidos ou mais alcalinos, respectivamente. Fez-se este estudo para bionanoconjugados com uma razão [PpcA]/[AuNP-MUA] igual a 200, ou seja 3 nM de AuNP-MUA e 600 nM de PpcA variando o pH de uma em uma unidade numa gama entre 2 e 11. Para todos os valores de pH obteve-se o espectro UV/Visível num espectrofotómetro Cary 50 Bio da Varian, imediatamente após o acerto do pH.

Foi feito também o mesmo estudo adicionando directamente os volumes necessários, de NaOH e HCl, para atingir determinado valor de pH obtendo o espectro de UV/Visível imediatamente após o acerto de pH e também após 6 horas.

2.4.3 Estabilidade à agregação por NaCl dos bionanconjugados de PpcA e AuNP-MUA ao longo do tempo

Foram preparados 10 mL de bionanoconjugados de razão [PpcA]/[AuNP-MUA] igual a 75 da forma descrita anteriormente.

Foi feito o estudo de estabilidade à concentração de NaCl, da maneira anteriormente descrita, aos bionanoconjugados com diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4, 7, 15 e 30 dias), utilizando sempre as mesmas concentrações de NaCl em todos os dias.

2.5 Actividade da PpcA na Detecção Electroquímica de Cromato

2.5.1 Sistema Electroquímico

O sistema electroquímico foi preparado utilizando uma montagem clássica de 3 eléctrodos (eléctrodo de referência, eléctrodo de trabalho e eléctrodo auxiliar). O eléctrodo de referência foi montado utilizando um fio de prata recoberto com AgCl num capilar de Luggin contendo uma solução aquosa de KCl 3 M e saturada com AgCl. O eléctrodo de trabalho

consiste num eléctrodo de vidro de FTO (óxido de estanho dopado com fluoreto) e o eléctrodo auxiliar consiste num fio de Pt num capilar de Luggin contendo uma solução aquosa de KNO_3 0,1 M como electrólito de suporte. Todas as soluções de trabalho foram preparadas, conforme o propósito, utilizando sempre KNO_3 0,1 M como electrólito de suporte e tampão fosfato 10 mM pH 7, sendo estas soluções sempre desajeradas antes das medidas de voltametria cíclica.

As medidas electroquímicas foram efectuadas num potenciostato CHInstruments 600D.

2.5.2 Montagem do eléctrodo nanoestruturado FTO-Au

A montagem do eléctrodo de ouro nanoestruturado foi realizada pela electrodeposição de Au^0 a partir de uma solução contendo HAuCl_4 (Aldrich 99,99%) com 0,150 g/L, KNO_3 0,1 M como electrólito de suporte e tampão fosfato 10 mM pH 7, sobre um eléctrodo de FTO. O eléctrodo de FTO foi previamente limpo utilizando solução piranha (H_2O_2 concentrado e H_2SO_4 concentrado numa proporção de 1:1) durante 15 minutos e lavado com água milli Q em abundância. Após a limpeza do eléctrodo de FTO, realizaram-se varreduras no sentido catódico entre 0 e -1,0 V (vs. Ag/AgCl) com velocidade de varrimento de 0,010 V/s, de modo a depositar 5 camadas (5 ciclos de electrodeposição), seguida de lavagem dos eléctrodos.

2.5.3 Preparação dos Bionanoeléctrodos de FTO-Au-PpcA

A formação do bionanoeléctrodo foi feita a partir da modificação do eléctrodo FTO-Au pela PpcA, utilizando o método de *cross linking* com EDC/NHS¹⁰¹. O eléctrodo de FTO-Au foi inicialmente mergulhado numa solução etanólica de ácido 3-Mercaptopropanóico (MPA) com uma concentração de 10 mM e deixando a incubar durante 12h.

Os eléctrodos, já modificados com MPA, foram então colocados numa solução aquosa de EDC 28 mM e de NHS 12 mM e deixando a incubar durante 6h.

Por fim os eléctrodos foram colocados numa solução de PpcA 13 nM deixando a incubar durante 24h.

Cada um dos processos de modificação foi acompanhado por voltametria cíclica de modo a verificar o processo de ligação em cada uma das etapas.

Capítulo III: Apresentação e Discussão de Resultados

3 Apresentação e Discussão dos Resultados

3.1 Sobreexpressão e Purificação da PpcA

3.1.1 Purificação da PpcA

Após a sobreexpressão da PpcA procedeu-se à sua purificação por cromatografia de permuta iónica e cromatografia de exclusão molecular.

Na cromatografia de permuta iónica efectuada a pH 8,5 obteve-se o cromatograma apresentado na figura 6.1 (Apêndice I). Face ao valor do ponto isoeléctrico da PpcA (9,44^{36,39}), a este valor de pH a proteína fica retida na coluna catiónica. Contudo, por análise do cromatograma verifica-se que ainda antes de se iniciar o gradiente de NaCl há eluição de espécies que não correspondem à proteína de interesse.

Com o aumento linear do gradiente de NaCl observa-se que sensivelmente a 40% do gradiente, correspondendo a uma concentração de 120 mM de NaCl, começa a ocorrer a eluição da PpcA (fracções 6-16), isto deve-se ao facto de existir uma grande contribuição de cationes Na^+ a competir com a proteína pela adsorção à coluna. Foram recolhidas as 10 fracções de 1 mL já indicadas, sendo que as fracções nas extremidades da banda de eluição da PpcA no cromatograma (figura 6.1, no Apêndice I) foram seleccionadas por análise em UV/Visível, registando a absorvância a 210 nm, comprimento de onda típico de ligações peptídicas, e a 408 nm, comprimento de onda específico para a banda de Soret de citocromos c. A razão entre estes dois valores de absorvância é indicativa da pureza da fracção sendo que razões elevadas (~1) correspondem a um maior enriquecimento em PpcA.

Após a junção das fracções e a sua concentração da amostra, para 2 mL e procedeu-se ao segundo passo de purificação, a cromatografia de exclusão molecular.

Na cromatografia de exclusão molecular obteve-se o cromatograma apresentado na figura 6.2 (Apêndice I). Por análise do cromatograma verifica-se que existe uma grande banda (fracções 18-25) correspondente à eluição da PpcA que se inicia a cerca de 82 minutos após a injeção da amostra na coluna. Isto é devido ao pequeno peso molecular da PpcA (9,57 kDa)^{36,38} que vai passando pelos poros da resina fazendo com que a amostra demore mais tempo a ser eluída e obtendo assim uma amostra de PpcA pura. As fracções puras foram concentradas para um volume de 2 mL e doseadas por espectroscopia de UV/Visível da amostra, cujo espectro é apresentado na figura 3.1. A concentração final de PpcA obtida foi de 398 μM .

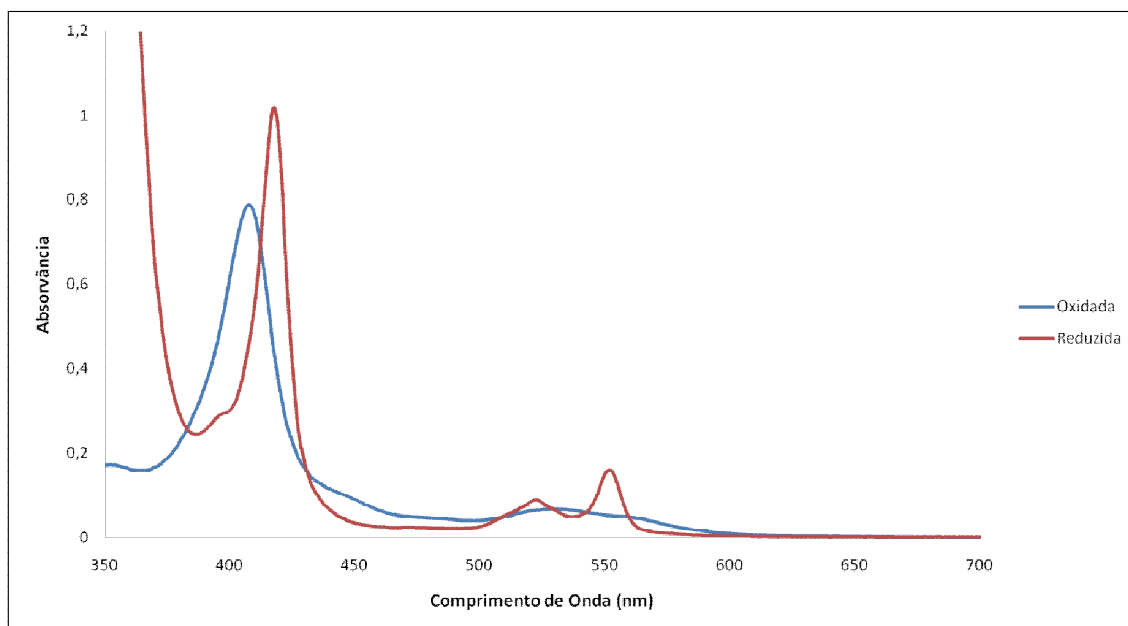


Fig. 3.1 - Espectro de UV/Visível da PpcA na forma oxidada (linha azul) e na forma reduzida (linha vermelha).

Por análise do espectro da figura 3.1 pode-se observar que existem diferenças entre os espectros da forma reduzida e da forma oxidada da PpcA que já foram referidas na “Introdução Teórica”, pág. 13.

3.2 Síntese e Estabilidade das Nanopartículas de Ouro

3.2.1 Síntese e funcionalização das Nanopartículas de Ouro

Após a síntese das nanopartículas de ouro foi feito o seu doseamento, recorrendo-se ao espectro de UV/Visível apresentado na figura 3.2. A solução de AuNP apresenta uma intensa coloração vermelha, acompanhada por uma banda de absorção a cerca de 520 nm denominada de banda de ressonância plasmônica de superfície, que é dependente da concentração.

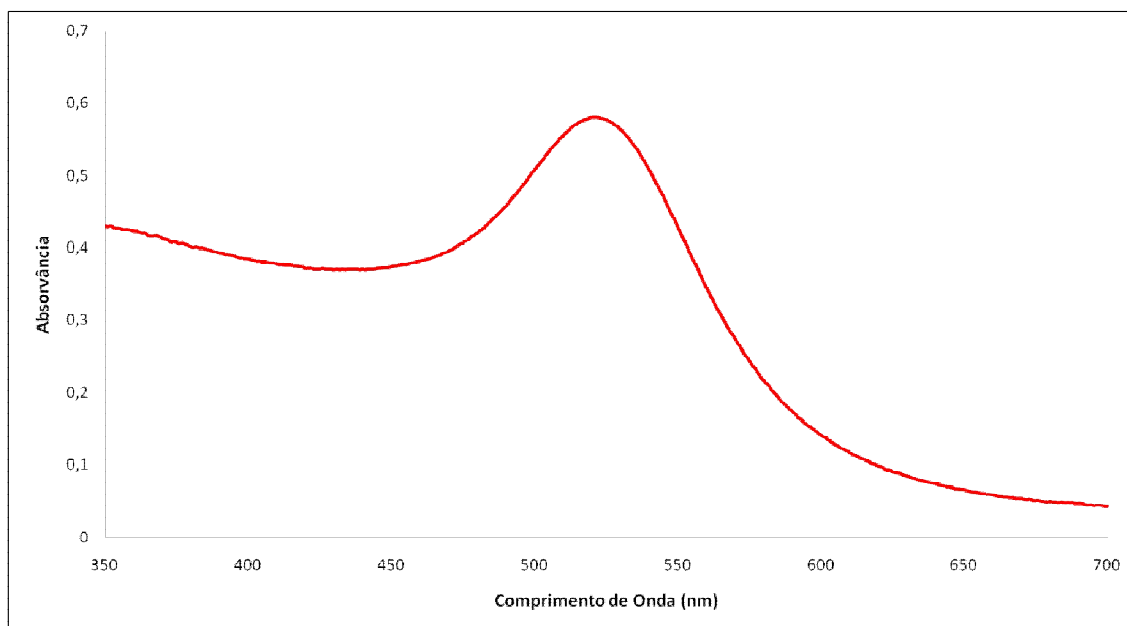


Fig. 3.2 - Espectro de UV/Visível de uma solução de AuNP.

A determinação da concentração é feita a partir do método descrito por Haiss et al.⁶⁵. Este método consiste em fazer a razão da absorvância da plasmónica, neste caso a 520 nm, com a absorvância a 450 nm, em que a absorvância a este comprimento de onda é completamente independente da contribuição de agregados. Seguidamente o valor desta razão é comparado com uma recta de calibração descrita no método publicado⁶⁵ em que se consegue determinar o diâmetro das AuNP, neste caso 15 nm. Após determinação do diâmetro das AuNP pôde-se através duma tabela verificar qual o coeficiente de extinção molar a 450 nm, neste caso $2,18 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Assim, a partir do valor de absorvância, a 450 nm, de 0,373 e atendendo ao factor de diluição (10x) utilizado para obter o espectro da figura 3.2, determinou-se a concentração das AuNP sintetizadas que é 11,78 nM.

A funcionalização é feita, como descrito na parte experimental, adicionando à solução de AuNP uma quantidade molar 120 vezes superior de MUA de modo a revestir a nanopartícula.

3.2.2 Estabilidade das Nanopartículas de Ouro a diferentes concentrações de NaCl

A estabilidade da solução de AuNP-MUA é dependente da força iónica da mesma. Assim, para obter informação a que forças iónicas é que é possível manter uma solução de AuNP-MUA sem agregação, efectuou-se um estudo no qual se aumentou, progressivamente, a concentração de NaCl na solução (figura 3.3).

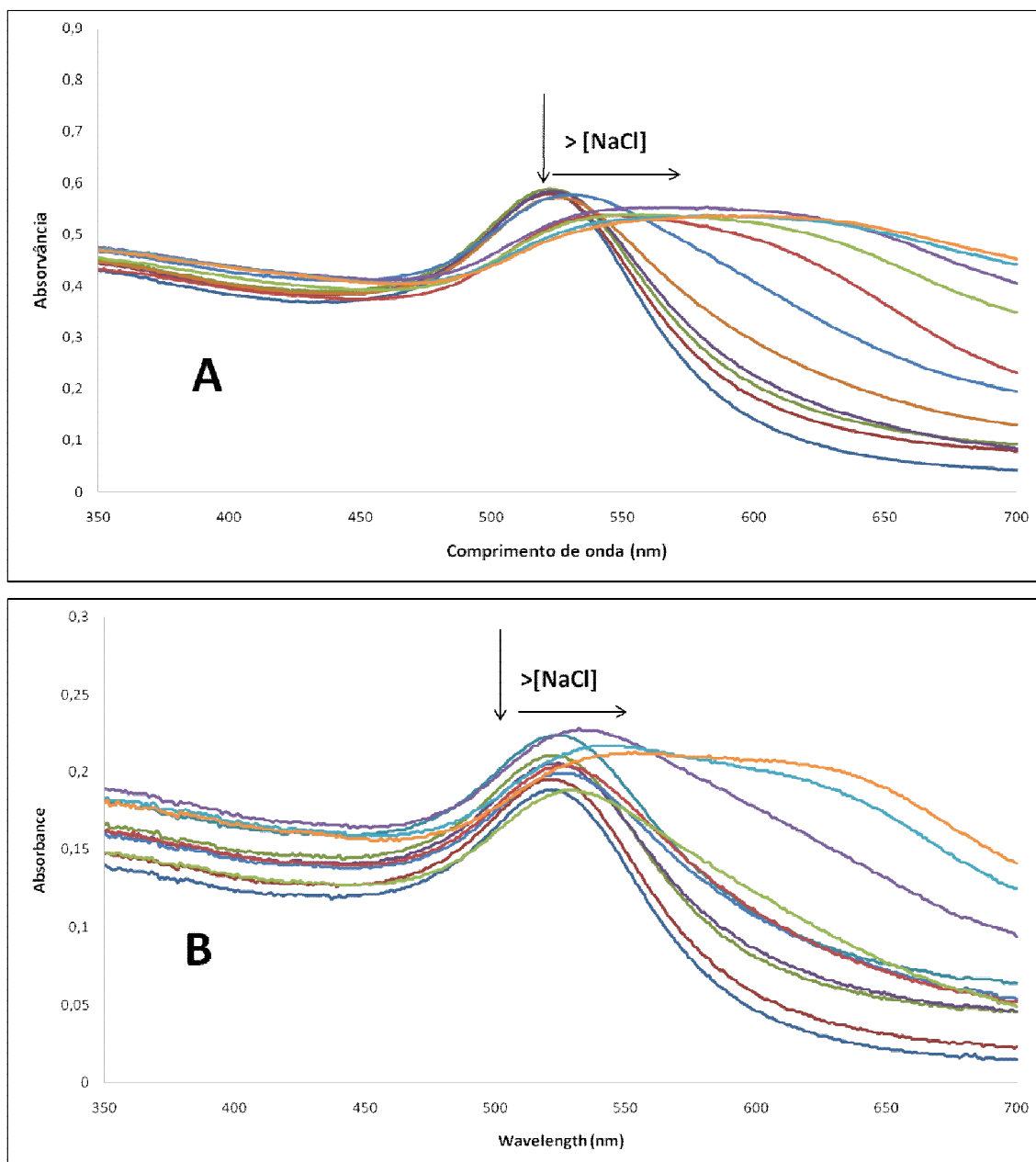


Fig. 3.3- Espectros de UV/Visível de AuNP-MUA com concentração de 3 nM (A) e 1 nM (B), com diferentes concentrações de NaCl.

Nos espectros de UV/Visível das AuNP-MUA apresentados na figura 3.3 podemos observar que estes se vão alterando à medida que a concentração de NaCl, na solução, aumenta. Nomeadamente, à medida que a concentração de NaCl aumenta, dá-se um desvio da banda de plasmónica de superfície, situada, numa solução de ouro coloidal estável, a 520 nm, para comprimentos de onda mais elevados, indicando a agregação e perda da estabilidade coloidal da solução de AuNP-MUA. Isto acontece devido à alteração da solvatação das nanopartículas com a adição de iões Na^+ e Cl^- , que irão competir, com as AuNP-MUA, pelas moléculas de água, responsáveis pela solvatação destas. Assim, as AuNP-MUA ao deixarem de estar solvatadas, ficam expostas também aos iões Na^+ que cancelarão as cargas negativas

existentes na superfície das partículas e que são responsáveis pela repulsão electrostática, entre partículas, que garante uma suspensão de ouro coloidal estável e monodispersa. Não havendo esta repulsão, as nanopartículas tendem a formar agregados de diferentes tamanhos tornando assim a suspensão polidispersa e instável. Estes agregados têm um comportamento espectral, idêntico a partículas de maiores dimensões, em que a banda da plasmónica irá absorver radiação a um comprimento de onda mais elevado, na zona do vermelho.

Este comportamento espectral é acompanhado pela mudança de cor da solução que passa de vermelho para azul nos casos em que a concentração de NaCl adicionada é suficiente para induzir a agregação das AuNP-MUA.

Para compreender qual a concentração de NaCl mínima necessária para induzir a agregação das AuNP-MUA calculou-se um parâmetro que indica quando a solução de AuNP-MUA está agregada, este parâmetro denomina-se razão de agregação. O seu cálculo consiste no quociente da absorvância ao comprimento de onda em que, na forma totalmente agregada, a absorvância é máxima pela absorvância ao comprimento de onda em que, na forma não agregada, a absorvância é máxima. Este cálculo é efectuado em todos os espectros da gama de adição de NaCl. Neste caso em particular calculou-se a razão de agregação pelo quociente $\text{Abs } 600 \text{ nm} / \text{Abs } 520 \text{ nm}$ (figura 3.4).

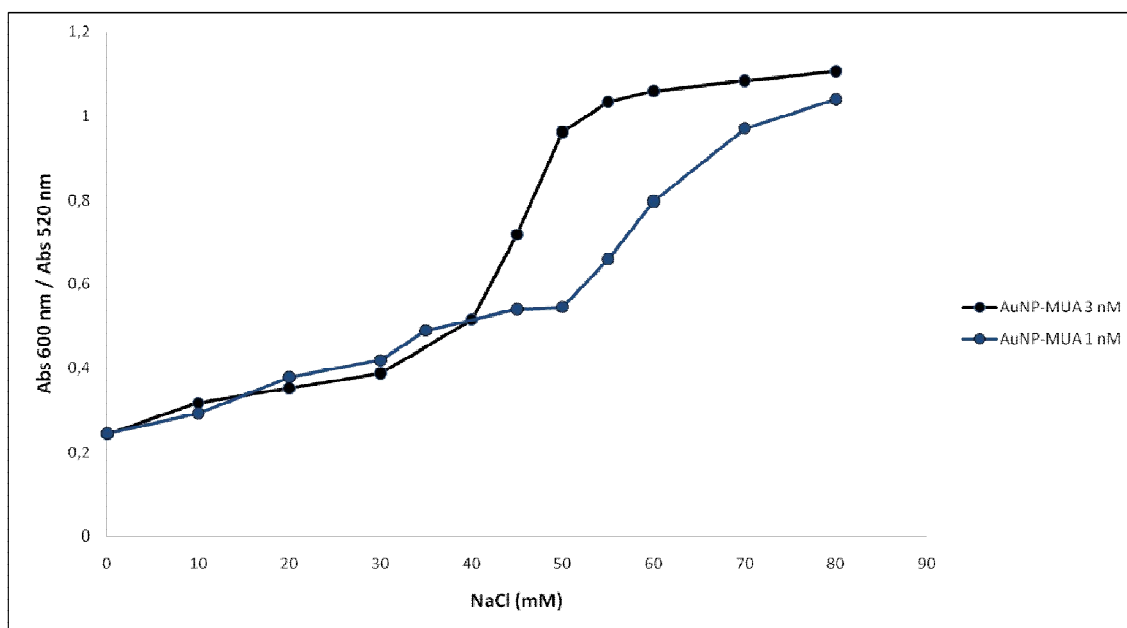


Fig. 3.4 - Gráfico da razão de agregação das AuNP-MUA de 3 nM (preto) e de 1 nM (azul) em função da concentração de NaCl.

No gráfico apresentado na figura 3.4, pode-se observar que o perfil de agregação é diferente para as duas concentrações de AuNP-MUA.

Para as AuNP-MUA a 3 nM sem adição de NaCl a razão de agregação toma um valor de 0,2 sendo este valor indicativo da razão de agregação de nanopartículas não agregadas. A

razão de agregação mantém-se próxima de 0,2, indicando que predomina a forma não agregada, até uma concentração de 30 mM de NaCl, sendo que a partir dessa concentração a forma agregada é predominante da solução.

Para as AuNP-MUA a 1 nM a razão de agregação, sem a adição de NaCl, toma o valor característico da forma não agregada e mantém um valor relativamente próximo até uma concentração de 50 mM de NaCl, indicando que a partir dessa concentração as AuNP-MUA perdem a sua estabilidade, predominando na solução a forma agregada.

Este resultado indica que é necessário adicionar uma maior quantidade de NaCl para soluções de AuNP-MUA mais diluídas para induzir a agregação. Isto verifica-se devido a uma maior quantidade de moléculas de água, presentes na solução mais diluída, que irão solvatar os iões Na^+ e Cl^- adicionados. É necessário ter uma maior concentração de iões na solução para competir com as AuNP-MUA e assim cancelar as cargas negativas à sua superfície, promovendo a agregação destas. Nas soluções de AuNP-MUA mais diluídas, as nanopartículas irão estar também mais afastadas na solução e como tal existe uma menor probabilidade destas se aproximarem e agregarem, então é necessário adicionar uma maior quantidade de NaCl, relativamente às soluções mais concentradas, para induzir a agregação das nanopartículas.

3.2.3 Estabilidade das Nanopartículas de Ouro a diferentes valores de pH

A estabilidade da solução de AuNP-MUA depende do pH do meio em que se encontram, para obter informação a que valores de pH estas são estáveis foi feito um estudo onde se variou o pH da solução.

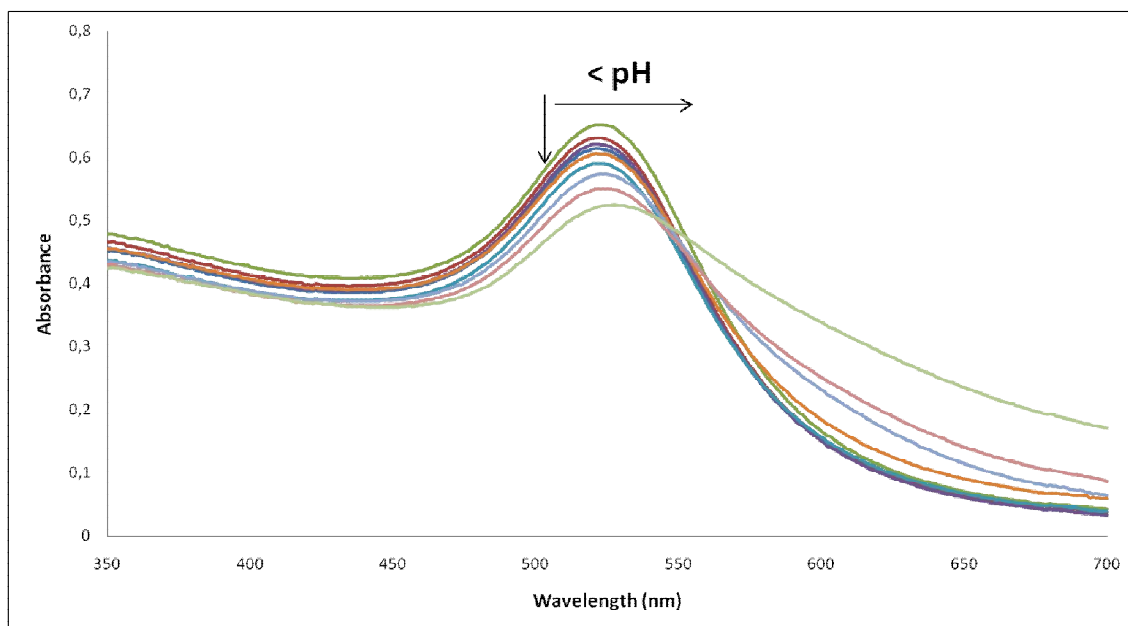


Fig. 3.5 - Espectros de UV/Visível de AuNP-MUA (3 nM) a diferentes valores de pH.

No gráfico da figura 3.5 pode-se observar que os espectros de UV/Visível das AuNP-MUA podem sofrer alterações em determinados valores de pH. Estas alterações ao espectro, diminuição da banda da plasmónica a 520 nm e aumento da absorvância a comprimentos de onda maiores, são causadas pela agregação das AuNP-MUA. A agregação induzida pelo pH deve-se ao facto de se atingir o pK_a (4,4-5,7)^{104,105} do agente de revestimento das nanopartículas de ouro, neste caso o ácido 11-mercaptopundecanóico, que ao ser protonado deixa de conferir à superfície das nanopartículas de ouro uma carga negativa responsável pelas interações de repulsão entre partículas criando instabilidade na solução coloidal e por sua vez promovendo a agregação das mesmas. Este comportamento é acompanhado pela alteração de cor da solução de AuNP-MUA que passa de vermelho para azul, nos casos em que há agregação.

Com o intuito de saber exactamente em que valor de pH é que se inicia a agregação das AuNP-MUA procedeu-se ao cálculo das razões de agregação, para cada valor de pH, de maneira análoga à efectuada durante o estudo da estabilidade das AuNP-MUA a diferentes concentrações de NaCl.

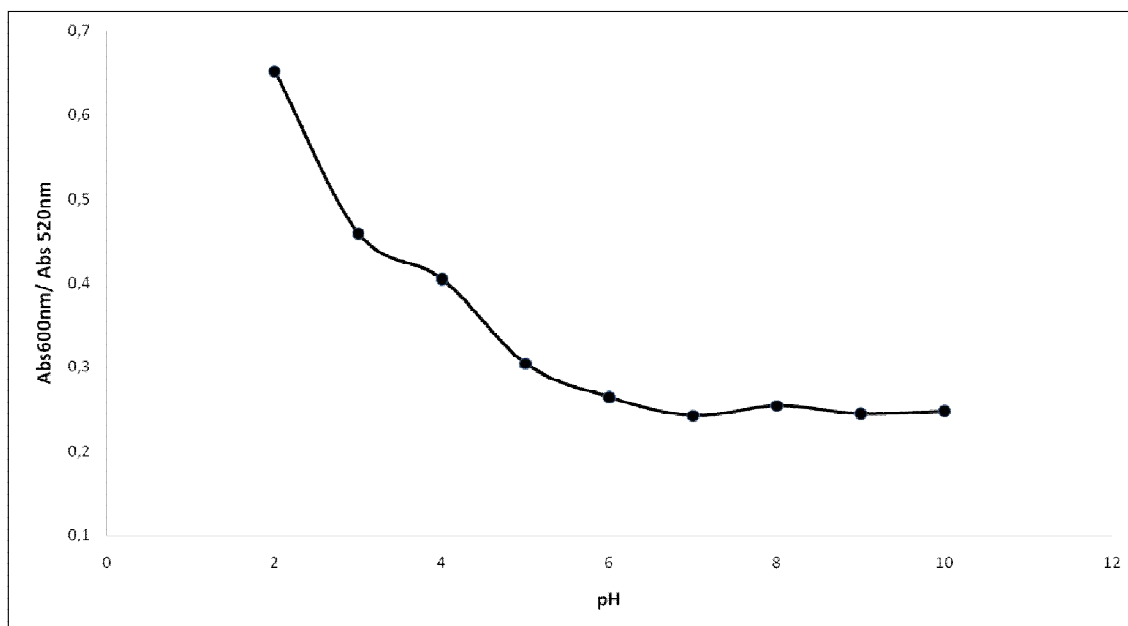


Fig. 3.6 - Gráfico da razão de agregação das AuNP-MUA de 3 nM em função do pH.

Como se pode ver pela análise à figura 3.6 a valores de pH alcalinos a espécie não agregada é predominante devido à carga superficial negativa conferida pelo agente de revestimento, mantendo assim a estabilidade da solução coloidal. No entanto a partir de valores de pH mais ácidos que 5, dá-se a agregação das AuNP-MUA causada pela protonação do agente de revestimento.

3.3 Formação dos Bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA

3.3.1 Medições de Potencial Zeta dos Bionanoconjugados

Com o intuito de comprovar a conjugação da PpcA com as AuNP-MUA, fizeram-se bionanoconjugados de diferentes razões $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ como descrito na parte experimental, para proceder às medições de Potencial Zeta. Na figura 3.7 representam-se os valores de potencial zeta de cada uma das soluções de bionanoconjugados com diferentes proporções de PpcA e AuNP-MUA, sendo que a concentração de AuNP foi de 3 nM para todas as razões.

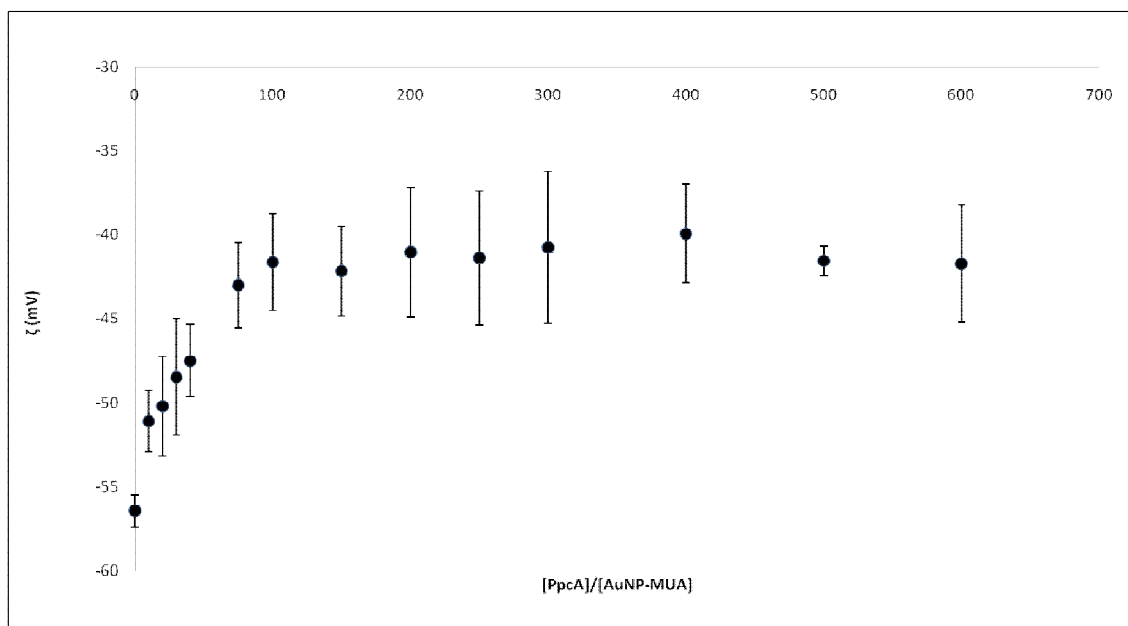


Fig. 3.7 - Gráfico dos valores do potencial zeta em função da razão [PpcA]/[AuNP-MUA] de bionanoconjugados (AuNP 3 nM).

Analisando o gráfico apresentado na figura 3.7 pode-se observar que à medida que a concentração de PpcA aumenta, na solução de bionanoconjugados, o potencial zeta torna-se menos negativo. Na solução de bionanoconjugados de razão 0, o potencial zeta toma o valor de -56 mV e estabiliza, com o aumento da quantidade de PpcA na solução, por volta de -41 mV. O potencial zeta está relacionado com a carga superficial das nanopartículas, como está explicado na “Introdução Teórica”, pág 23. Assim, esta alteração no valor de potencial zeta é indicativa que está a ocorrer conjugação entre a PpcA e as AuNP-MUA, pois a carga à superfície da nanopartícula torna-se menos negativa devido à interacção electrostática com os resíduos da PpcA, que a pH 11, se encontram carregados positivamente.

Para compreender melhor esta alteração ao valor de potencial zeta calculou-se a variação do potencial zeta para cada solução de bionanoconjugados e ajustou-se uma curva (figura 3.8), baseada na equação de isotérmicas de adsorção de Langmuir^{82,89}:

$$\Delta\zeta = (\Delta\zeta_{\text{Max}} K_L R) / (1 + K_L R) \quad (\text{Equação 2})$$

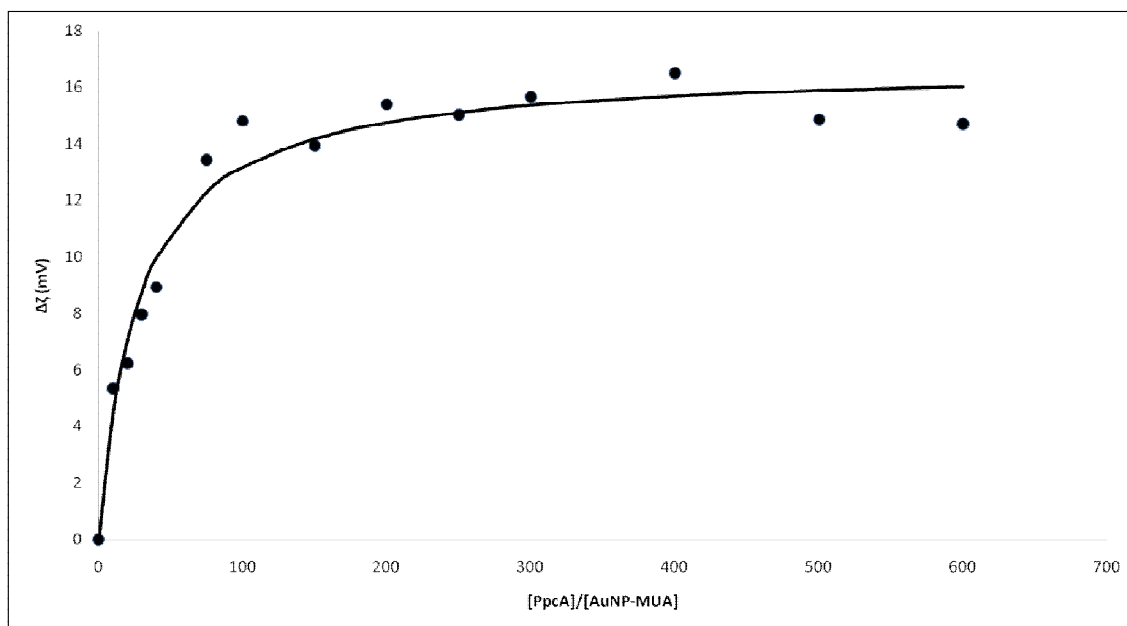


Fig. 3.8 - Gráfico da variação do potencial zeta em função da razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ de bionanoconjugados. A linha contínua representa o ajuste efectuado, através da aplicação Solver do Microsoft Excel, utilizando a equação adaptada das isotérmicas de adsorção de Langmuir^{82,89} (Equação 2).

Por análise ao gráfico da figura 3.8, constata-se que de facto existe uma variação do potencial zeta à medida que a concentração de PpcA aumenta na solução de bionanoconjugados, havendo então uma estabilização dessa variação por volta dos 15 mV. Pode-se também observar que a estabilização da variação ocorre a partir das razões $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ entre 100 e 200, indicando que é entre estas duas razões que a nanopartícula está totalmente revestida com PpcA, pois para uma maior adição de PpcA, o potencial zeta não sofre alterações significativas. Assim, pode-se assumir que numa solução com 200 vezes mais PpcA que AuNP-MUA, estas se encontrem totalmente revestidas e que esta razão é uma boa proporção para a formação de bionanoconjugados. Através do ajuste dos dados experimentais a uma equação do tipo isotérmica de Langmuir (Equação 1) pôde-se calcular também o valor da constante de ligação, K_L , da PpcA com as AuNP-MUA. Para este conjunto de resultados a constante de ligação calculada é de 0,037.

3.3.2 Estudo da formação de bionanoconjugados por espectroscopia de UV/Visível

Para confirmar adicionalmente a formação de bionanoconjugados entre a PpcA e a AuNP-MUA, efectuou-se o espectro UV/Visível dos bionanoconjugados para diferentes razões $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ (Figura 3.9).

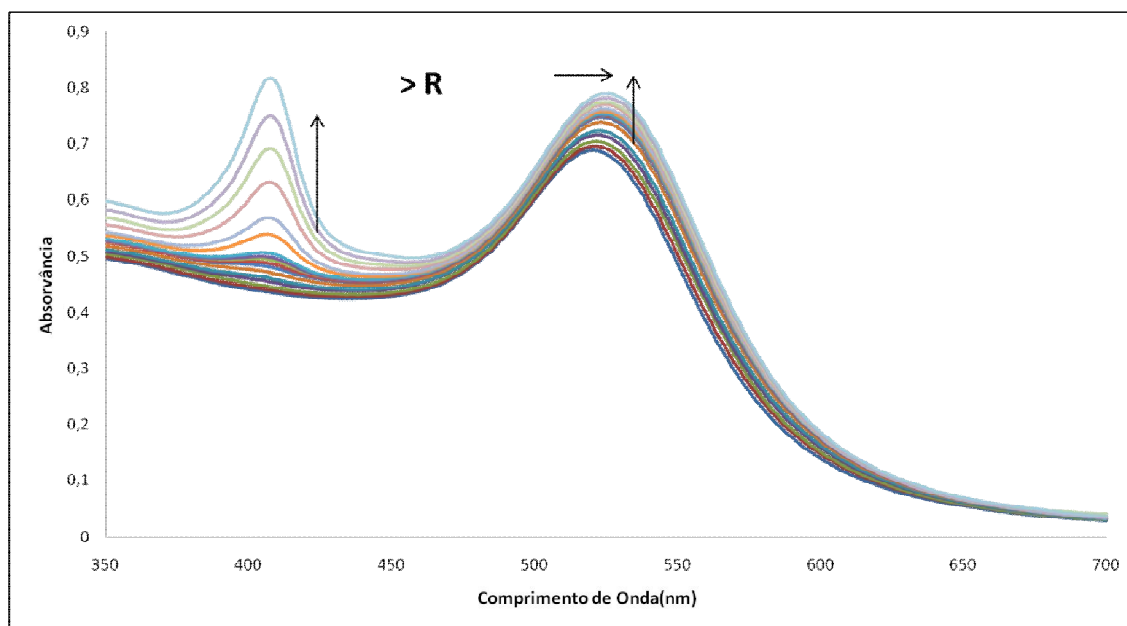


Fig. 3.9 – Espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA (3 nM) com diferentes razões (R), sendo $R = [PpcA]/[AuNP-MUA]$.

Como se pode ver pelos espectros apresentados na figura 3.9, à medida que a razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ aumenta ocorrem diferenças nos espectros. A banda de Soret vai aumentando de intensidade, gradualmente, à medida que a razão aumenta, obviamente devido à concentração de proteína em solução aumentar e como tal a banda de Soret é mais intensa. No entanto, também existem alterações na banda da plasmônica. Pode-se ver que à medida que a razão aumenta, a banda da plasmônica aumenta de intensidade e parece sofrer um desvio de alguns nanômetros.

Para visualizar melhor esta ocorrência fez-se um gráfico, apresentado na figura 3.10, em que se representa a variação do comprimento de onda da banda da plasmônica de superfície em função da razão de $[PpcA]/[AuNP-MUA]$.

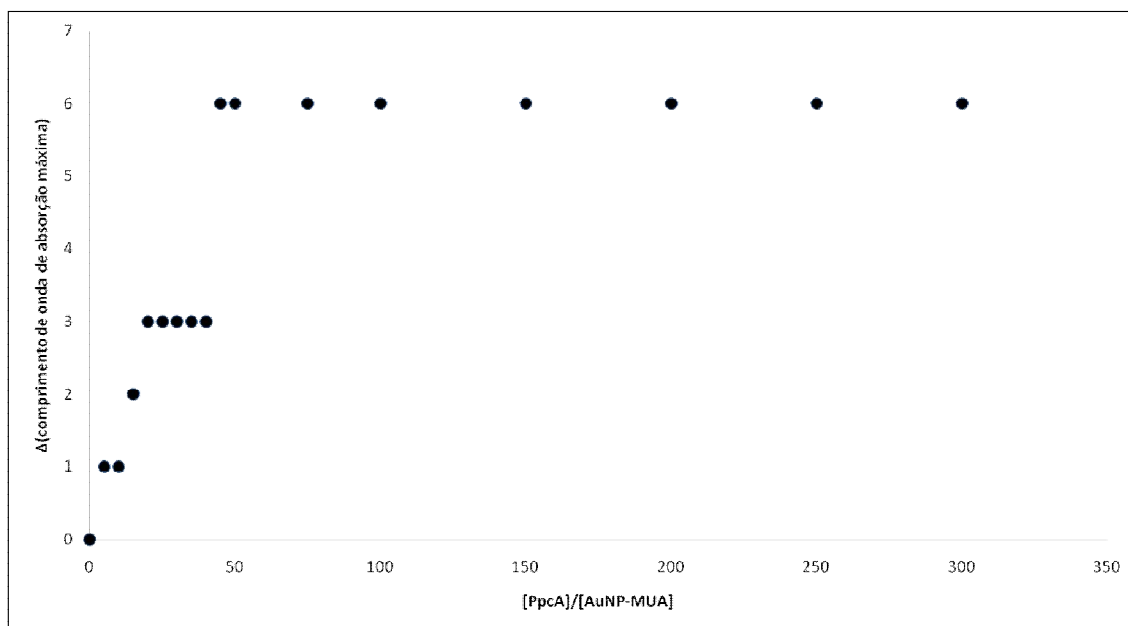


Fig. 3.10 – Gráfico do desvio do comprimento de onda da plasmônica em função da razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$.

Analisando a figura 3.10 pode-se ver que de facto existe um desvio positivo de alguns nanómetros da banda da plasmónica, em função da razão. Este desvio acaba por estabilizar em 6 nanómetros, indicando que possivelmente, ao se dar esta estabilização, a PpcA adicionada aos bionanoconjugados já não deverá estar a conjugar na sua totalidade ou que a superfície das nanopartículas, neste caso, já está suficientemente revestida de modo a não alterar o índice de refração do meio envolvente destas, pois as alterações neste parâmetro indicam a ocorrência de alterações no ambiente químico à superfície das nanopartículas, como é o caso da conjugação com proteínas^{55,56,59}.

Para verificar outras alterações nos espectros dos bionanoconjugados fez-se um espectro de UV/Visível da PpcA a cada uma das concentrações utilizadas nos diferentes bionanoconjugados, estes espectros são apresentados na figura 7.1 no Apêndice II. Com estes espectros, da PpcA e das AuNP-MUA sozinhas, fez-se um tratamento de dados de modo a subtrair a contribuição destas duas espécies nos espectros dos bionanoconjugados para determinar quais as alterações espectrais que são provocadas pela conjugação destas duas espécies, obtendo assim evidência espectral adicional para ocorrência de conjugação.

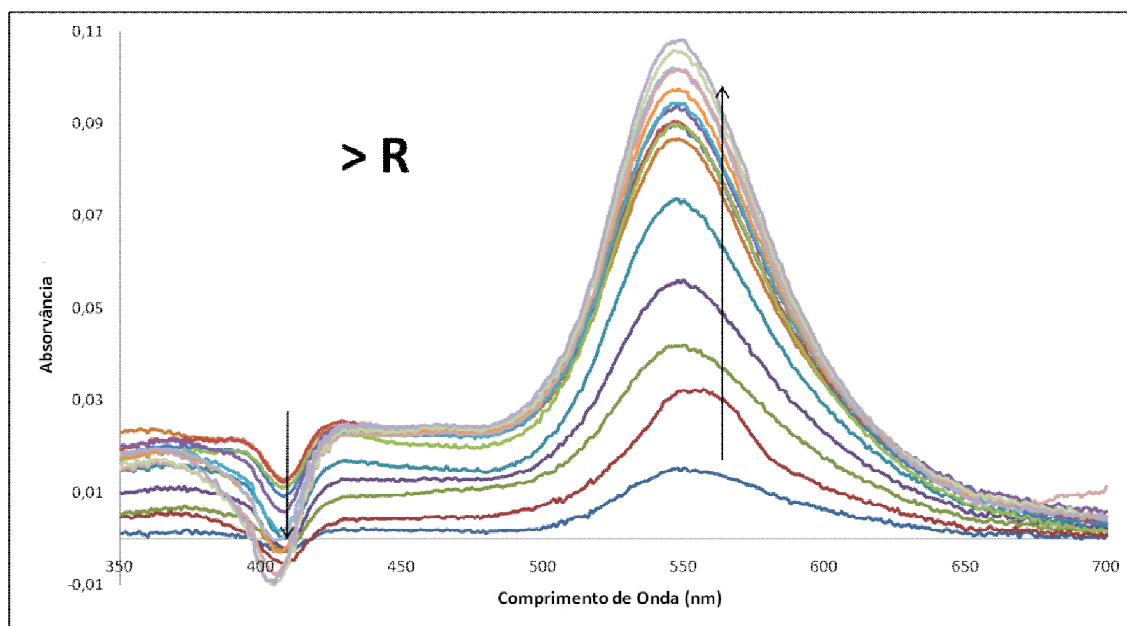


Fig. 3.11 – Espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados sem a contribuição da PpcA e das AuNP-MUA.

Observando a figura 3.11 nota-se que apesar de se ter subtraído as contribuições espectrais das duas espécies na forma não conjugada, existem diferenças que salientam e identificam a conjugação. Pode-se visualizar que ao subtrair a contribuição da PpcA, a banda de Soret não desaparece totalmente, em vez disso a banda fica invertida, indicando que a PpcA sozinha tem uma banda de Soret com maior intensidade do que os bionanoconjugados. Para determinar a contribuição da banda de Soret nos espectros da PpcA e dos bionanoconjugados, recorreu-se ao software PeakFit v4.12 que é um software de simulação de espectros em que foi possível determinar a contribuição da banda de Soret através da amplitude desta banda (Figura 3.13).

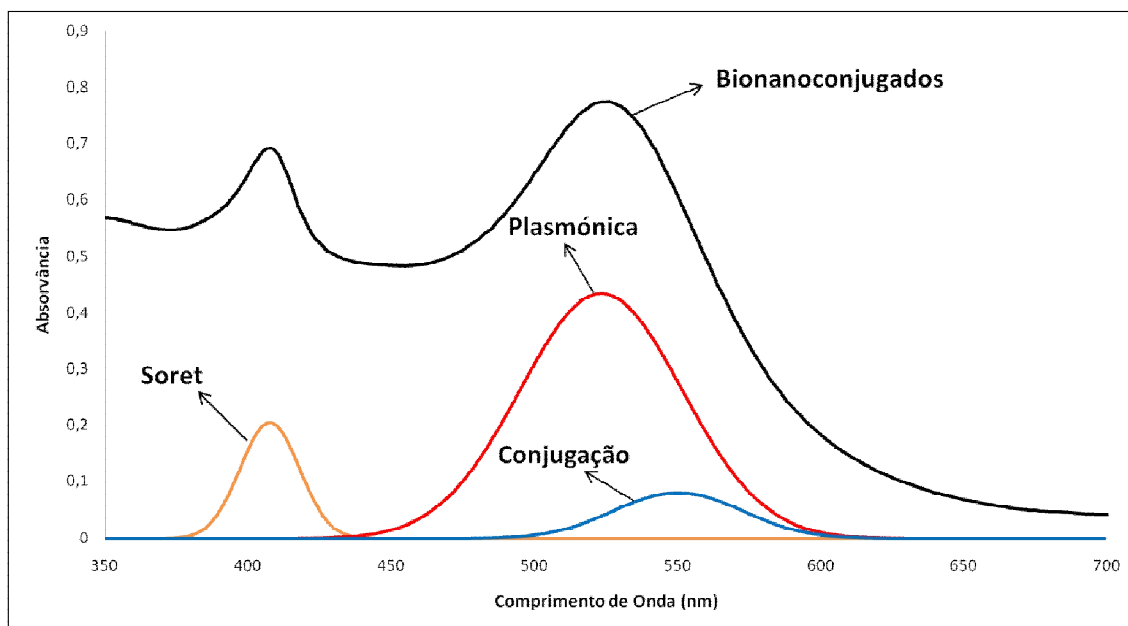


Fig. 3.12 – Simulação do espectro dos bionanoconjugados ($R = 200$) de PpcA e AuNP-MUA através do software PeakFit v4.12.

Como se pode ver pela figura 3.12 a simulação dos espectros dos bionanoconjugados leva à contribuição de 3 bandas distintas. A banda de Soret devido à presença da PpcA nos bionanoconjugados, a banda da plasmônica devido à presença de AuNP-MUA e a banda “nova” a 550 nm que indica a conjugação responsável pelo ligeiro desvio da banda da plasmônica no espectro real dos bionanoconjugados.

Verificou-se que a amplitude da banda de Soret nos bionanoconjugados, nos casos em que é visível, é sempre inferior à banda da PpcA na forma livre (Figura 3.13).

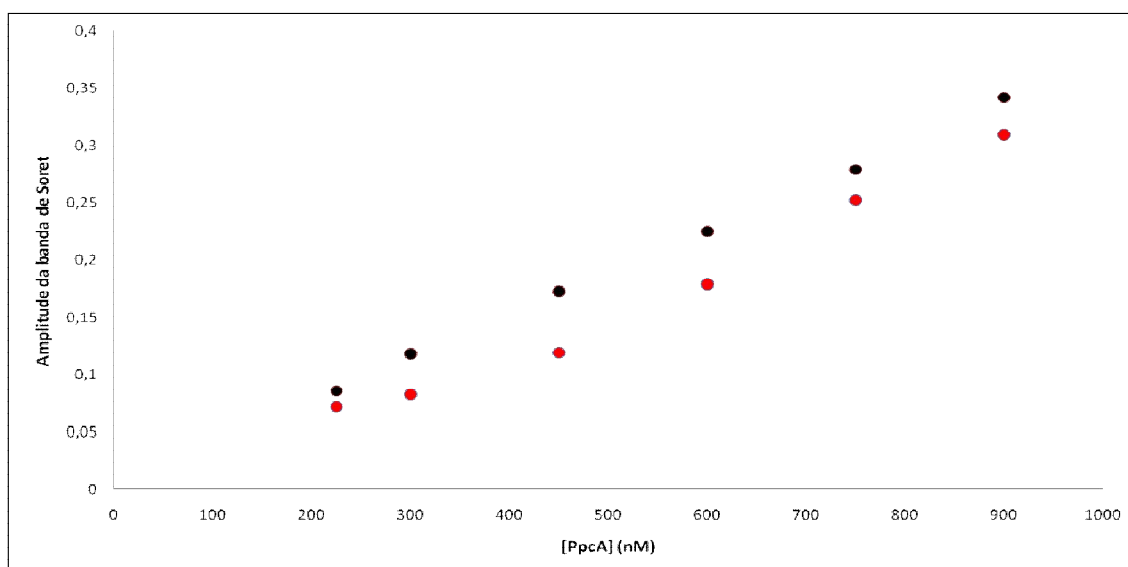


Fig. 3.13 – Gráfico da amplitude da banda de Soret da PpcA (preto) e dos bionanoconjugados (vermelho) em função da concentração de PpcA.

Como se pode ver pelo gráfico da figura 3.13 a amplitude da banda de Soret da PpcA é sempre superior em relação à banda dos bionanoconjugados. Este comportamento é indicativo da conjugação entre a PpcA e as nanopartículas. Esta diminuição da banda de Soret pode ocorrer devido à própria conjugação da PpcA que ao interagir electrostaticamente com a superfície das nanopartículas deixa de estar em solução e como tal a absorção da radiação não é tão elevada.

Na figura 3.9 pode-se ainda verificar a existência de uma banda a 550 nm que aumenta de intensidade à medida que a razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ aumenta, parecendo este aumento estabilizar nas razões mais elevadas, tal comportamento é um indicativo da conjugação¹⁰⁶. Para determinar a contribuição desta banda a 550 nm no espectro dos bionanoconjugados, recorreu-se de novo ao software PeakFit v4.12 para simular o aparecimento desta banda em cada um dos espectros dos bionanoconjugados de diferentes razões. Partindo dos espectros da figura 3.9, isolou-se a banda “nova” que aparece à medida que a razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ aumenta e verificou-se que a área da banda a 550 nm, em função da razão de concentrações, tem um comportamento semelhante à variação do valor do Potencial Zeta com o mesmo parâmetro.

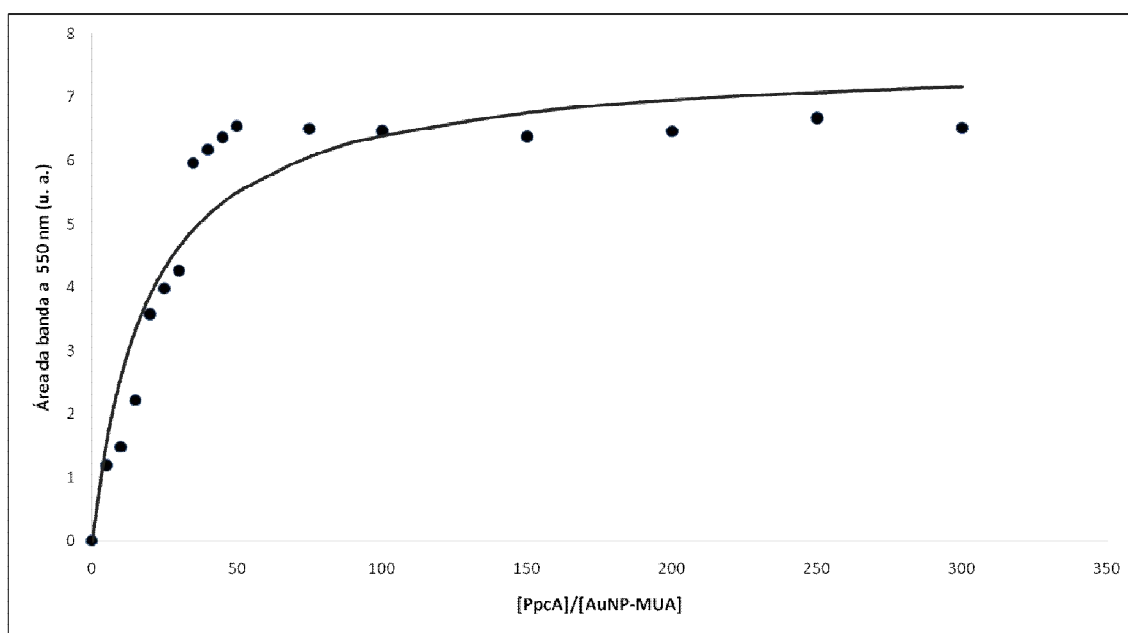


Fig. 3.14 – Gráfico do comportamento da área da banda, dos bionanoconjugados, a 550 nm, simulada pelo PeakFit v4.12, em função da razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$. A linha contínua representa o ajuste efectuado, através da aplicação Solver do Microsoft Excel, utilizando a equação adaptada das isotérmicas de adsorção de Langmuir^{82,89}, apresentada na “Introdução Teórica”.

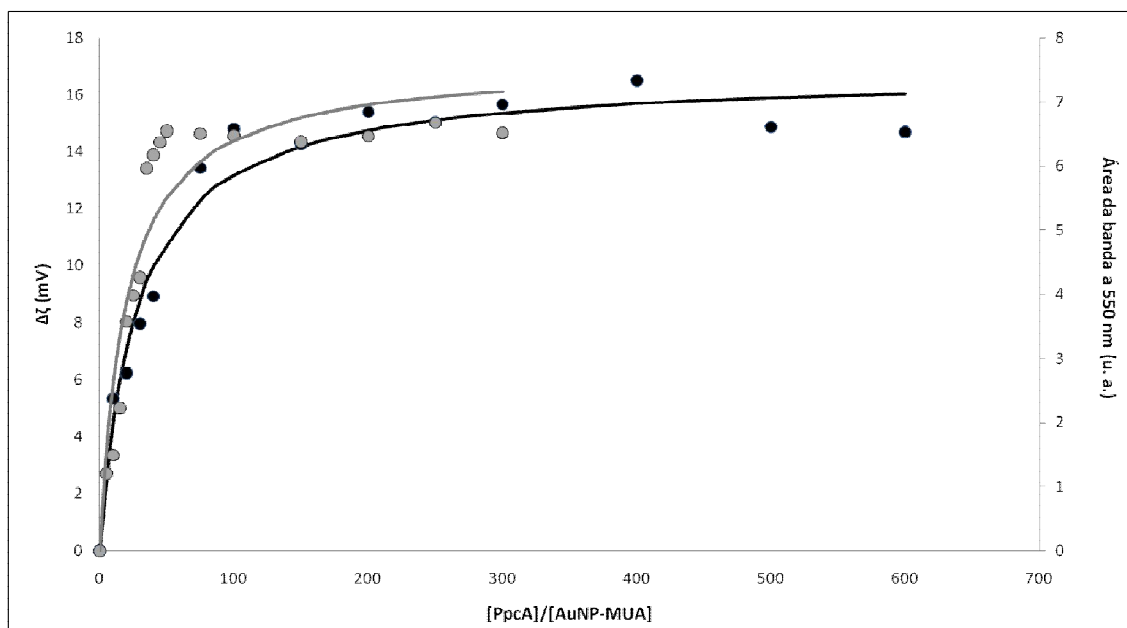


Fig. 3.15 – Gráfico da variação do potencial zeta (preto) e do comportamento da banda a 550 nm (cinzento), dos bionanoconjugados, em função da razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$. As linhas contínuas representam o ajuste efectuado, através da aplicação Solver do Microsoft Excel, utilizando a equação adaptada das isotérmicas de adsorção de Langmuir^{82,89}, apresentada na “Introdução Teórica”.

Como se pode ver pelos gráficos das figuras 3.14 e 3.15 o comportamento do aparecimento desta banda é semelhante à variação do valor de Potencial Zeta, em função da razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$, ou seja, à medida que existe mais proteína à superfície das nanopartículas a contribuição da banda a 550 nm vai aumentando até que esta contribuição acaba por estabilizar por volta da razão 75, indicando que a partir desta razão a contribuição da banda a 550 nm é constante. Com este ajuste foi possível retirar o valor da constante de ligação, K_L , que é de 0,052, um valor ligeiramente superior mas da mesma ordem de grandeza do valor obtido por Potencial Zeta (0,037).

3.3.3 Estudo da mobilidade electroforética dos bionanoconjugados em géis de agarose

A conjugação da PpcA com AuNP-MUA pode ser estudada, também, através da medição da mobilidade electroforética dos bionanoconjugados. Os bionanoconjugados de diferentes razões $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ ao conterem diferentes quantidades de proteína a revestir a superfície das nanopartículas irão possuir carga superficial e tamanho diferente. Assim, através de electroforeses em géis de agarose pode-se verificar a diferença na mobilidade dos bionanoconjugados. Foram feitas electroforeses em géis com concentrações de agarose de 0,5%, 1% e 2% para verificar a mobilidade para as diferentes densidades da matriz. Na figura 3.16 são apresentadas duas electroforeses em géis de 0,5% de agarose pois foi

nesta concentração em que a mobilidade e separação dos bionanoconjugados foram mais elevadas comparativamente com os géis de 1% e 2% de agarose, apresentados na figura 7.2 no Apêndice II.

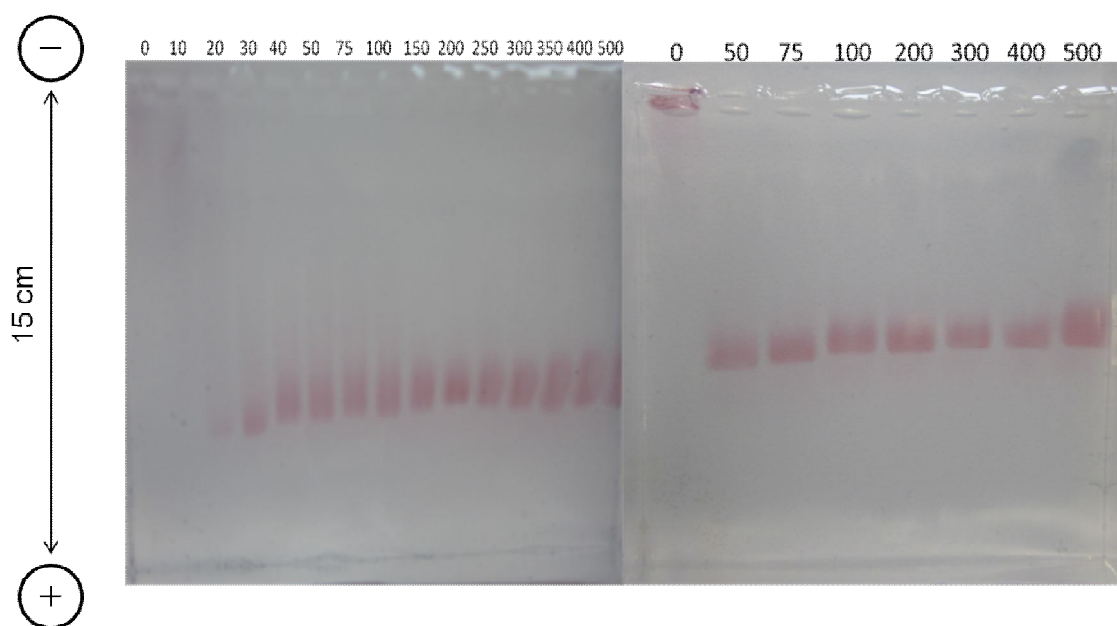


Fig. 3.16 – Esquema da separação dos eléctrodos no sistema de electroforese. Fotografias de electroforeses em géis de agarose de 0,5%, com 15 (esquerda) ou 8 (direita) poços, de bionanoconjugados com razões $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ diferentes, indicadas sobre o poço respectivo. Os géis correram durante 30 minutos com 150V com tampão TAE 1/8X a pH 8,5.

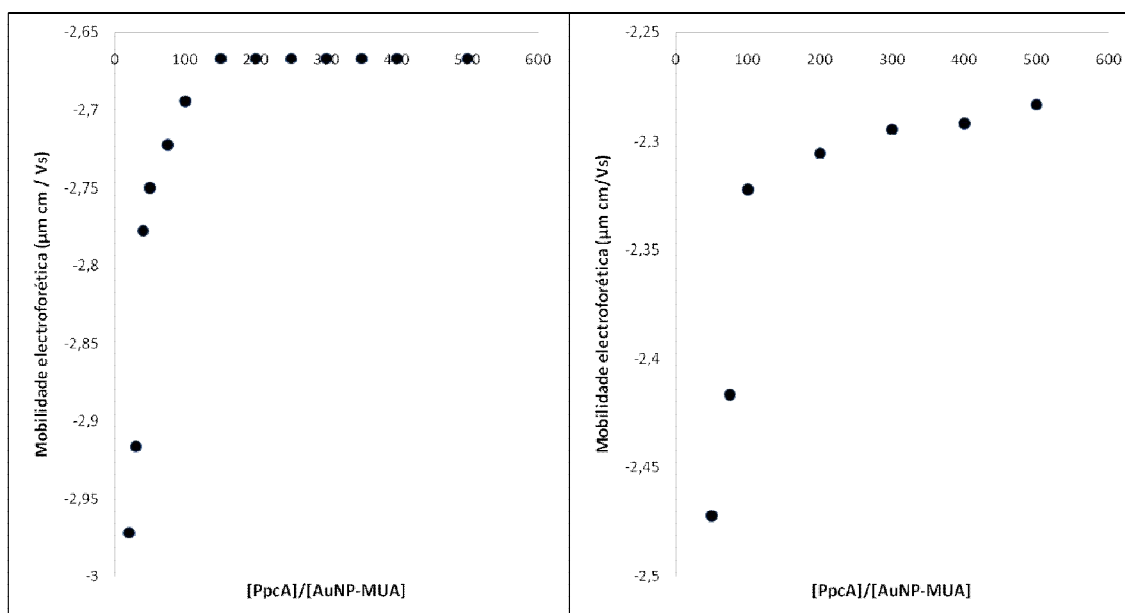


Fig. 3.17 – Gráficos da mobilidade electroforética dos bionanoconjugados nos géis de agarose 0,5%, com 15 (esquerda) e 8 (direita) poços, em função da razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$.

A mobilidade electroforética dos bionanoconjugados é dependente do tamanho e da carga destes. Como se pode observar na figura 3.16, os bionanoconjugados migram para o

pólo positivo o que se deve à grande densidade de carga negativa das AuNP-MUA, que é tanto maior quanto menos proteína estiver adsorvida à superfície destas (razões $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ menores). Além desta mobilidade vê-se também outro tipo de comportamento, nomeadamente a separação das bandas dos bionanoconjugados de diferentes razões. Em ambos os géis pode-se ver que os bionanoconjugados de razão 0, isto é as nanopartículas sozinhas, não migram quando sujeitas ao campo eléctrico de 150 V. Isto acontece devido às nanopartículas ao estarem desprotegidas, sem revestimento, agregarem na matriz, não saindo do poço. Pode-se ver também que à medida que a razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ aumenta, os bionanoconjugados aumentam de tamanho fazendo com que a migração no gel seja mais difícil e como tal migrando menos. Tal como anteriormente referido, outro factor que leva a uma menor migração para razões $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ maiores é o aumento do revestimento de proteína que leva a um maior escudamento da carga superficial negativa das AuNP-MUA.

Na electroforese com o gel de 15 poços pode-se ver que os bionanoconjugados de razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ igual a 10 também não saem do poço, isto acontece porque a quantidade de proteína não é suficiente para proteger as nanopartículas da agregação com a malha do gel. A partir dessa razão, consegue-se visualizar a banda dos bionanoconjugados que efectivamente migraram.

Em ambos os géis parece haver uma estabilização da migração dos bionanoconjugados aproximadamente entre a razão 100 e 200, em concordância com os dados obtidos por Potencial Zeta (Figura 3.8). Tal estabilização parece estar relacionada com o facto de deixar de haver conjugação a partir dessas razões $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ e assim o excesso de proteína na solução deixa de influenciar a migração dos bionanoconjugados.

Como se pode ver pelos gráficos apresentados na figura 3.17 existe um comportamento semelhante entre a mobilidade electroforética e o potencial zeta, em função da razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$. A mobilidade electroforética aumenta à medida que a concentração de proteína também aumenta, até que acaba por estabilizar devido à saturação da conjugação da PpcA com as nanopartículas. Entre a razão 150 e 200 começa a existir uma estabilização da mobilidade electroforética, o que está de acordo com os dados obtidos com o potencial zeta.

3.3.4 Estudo da conjugação através de espectroscopia de RMN

A formação dos bionanoconjugados foi também estudada por espectroscopia de RMN. Nesta técnica a prova da existência de conjugação é dada por observação directa de alterações no espectro da PpcA, contrariamente aos estudos de conjugação, anteriormente apresentados, em que a incidência era feita a alterações na nanopartícula, indicando a conjugação da PpcA à sua superfície.

Foram feitos espectros 1D- $[^1H]$ e 2D- $[^1H-^{15}N]$ -HSQC da PpcA na forma livre e conjugada com as nanopartículas de ouro (Figuras 3.18 e 3.19).

Na figura 3.18 apresentam-se os espectros 1D da PpcA e dos bionanoconjugados com diferentes razões [PpcA]/[AuNP].

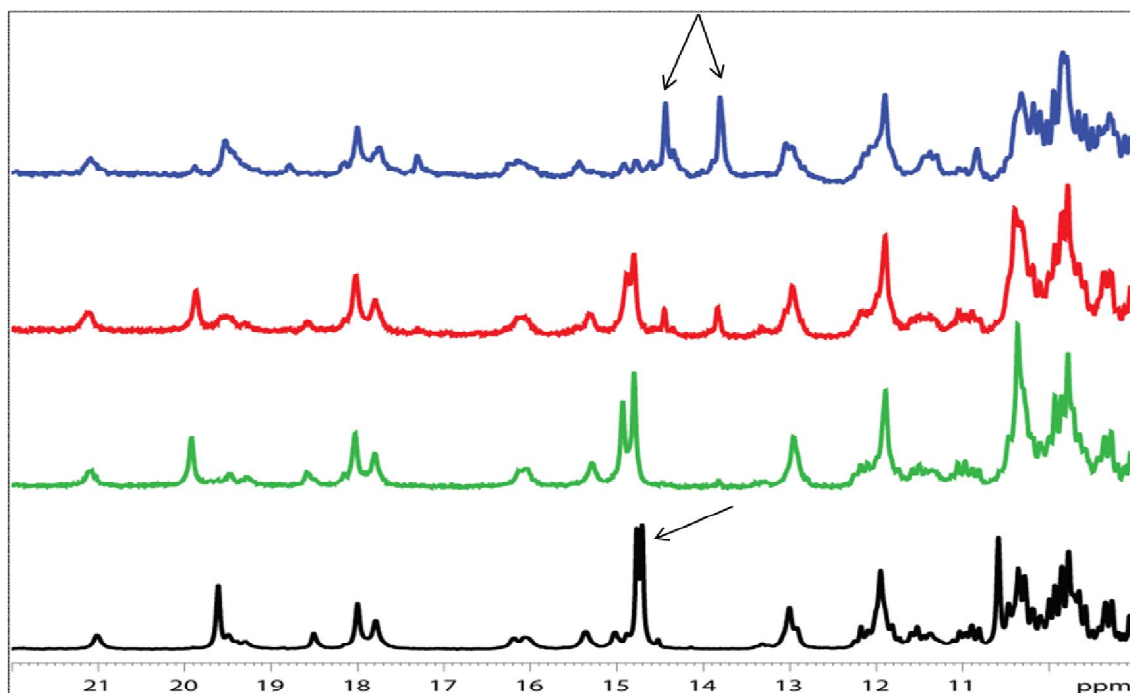


Fig. 3.18 – Espectro de RMN. 1D [¹H] da PpcA livre (preto) e dos bionanoconjugados com razões [PpcA]/[AuNP] de 600 (verde), 400 (vermelho) e 200 (azul), a 25°C e pH 8. As setas indicam os sinais mais afectados pela conjugação.

Como se pode observar existem algumas diferenças no espectro de RMN, nomeadamente nos sinais correspondentes aos prótons dos grupos metilo do Hemo IV¹⁰⁷ (indicados na figura 3.18 com setas) à medida que a concentração de nanopartículas aumenta. Este resultado sugere que na conjugação da PpcA com as AuNP ocorrem interações entre as imediações do Hemo IV e a superfície das AuNP.

De modo a analisar detalhadamente quais os aminoácidos da PpcA que estão directamente em contacto com a nanopartícula, efectuou-se um espectro 2D-[¹H-¹⁵N]-HSQC da PpcA e dos bionanoconjugados (Figura 3.19).

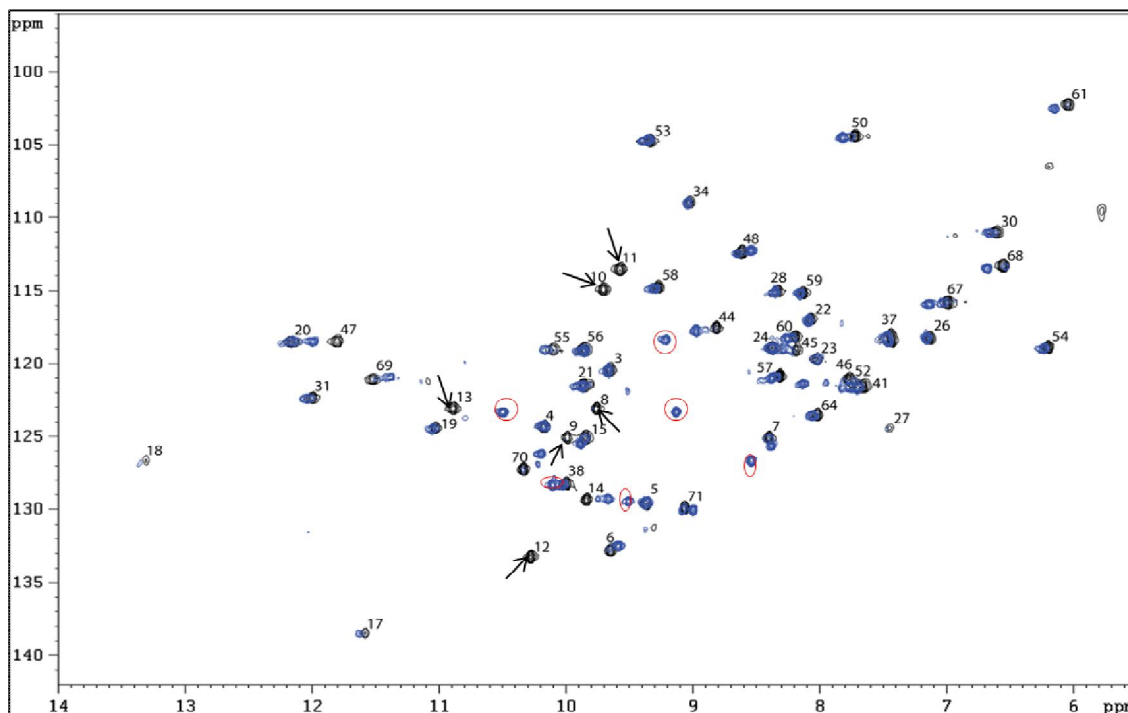


Fig. 3.19 – Espectro de RMN 2D-[^1H - ^{15}N]-HSQC da PpcA livre (preto) e dos bionanoconjugados de razão $[\text{PpcA}]/[\text{AuNP}]$ igual a 200 (azul), a 25°C e pH 8. Os números correspondem aos sinais dos grupos NH da cadeia polipeptídica da PpcA. Os sinais que apresentam maiores desvios aquando da conjugação estão assinalados com setas, no espectro da PpcA livre, e com círculos a vermelho, no espectro dos bionanoconjugados.

Analisando o espectro de RMN 2D-[^1H - ^{15}N]-HSQC apresentado na figura 3.19 pode-se constatar que a maioria dos sinais no espectro dos bionanoconjugados estão sobrepostos com os da PpcA. Apenas alguns apresentam desvios à posição inicial indicando que a interação entre a PpcA e a nanopartícula ocorre de forma específica. Os sinais assinalados com setas são aqueles que apresentam um maior desvio após a conjugação com as nanopartículas e correspondem aos aminoácidos alanina-8, lisina-9, asparagina-10, glicina-11, aspartato-12 e valina-13. Estes resíduos são contíguos na estrutura da PpcA, indicando que provavelmente a interação mais forte com a nanopartícula ocorre nesta zona da estrutura.

Existem também alguns sinais que aparecem desdobrados, isto é, no espectro dos bionanoconjugados aparece um sinal sobreposto ao sinal do mesmo resíduo no espectro da PpcA e outro ligeiramente desviado (Figura 3.20).

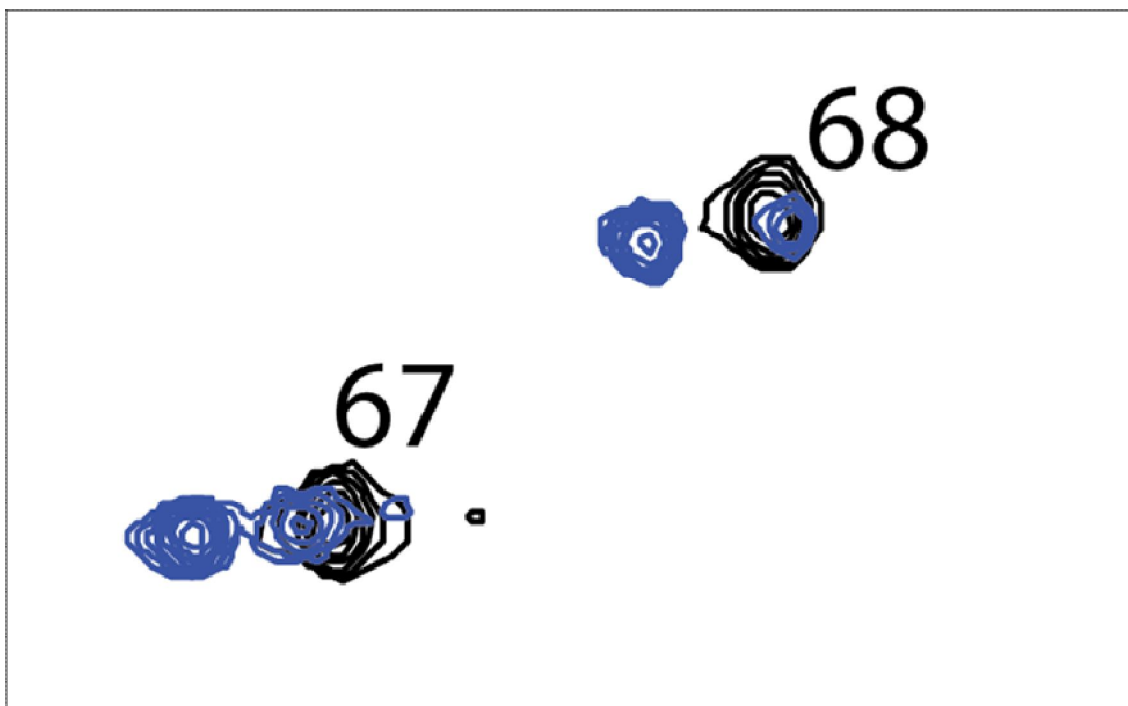


Fig. 3.20 – Secção do espectro 2D-[^1H - ^{15}N]-HSQC da PpcA (preto) e dos bionanoconjugados de razão $[\text{PpcA}]/[\text{AuNP}]$ igual a 200 (azul), a 25°C e pH 8.

Como se pode ver pela figura 3.20, os sinais dos resíduos glutamato-67 e cisteína-68 no espectro dos bionanoconjugados aparecem desdobrados revelando a existência de duas populações. Tal pode ser indicativo de que nestes resíduos a interacção com a nanopartícula não é tão forte como para os resíduos 8-13 anteriormente mencionados. Este efeito de desdobramento é igualmente observável nos resíduos 44 a 48 e 67 a 71, indicando que estas duas zonas também estão em interacção com as nanopartículas, apesar de ser uma interacção menos forte do que a observada para os resíduos 8 a 13.

Para confirmar se o comportamento observado se deve a uma interacção mais fraca entre os resíduos em questão e a nanopartícula, foi adquirido um espectro 2D-[^1H - ^{15}N]-HSQC de bionanoconjugados com uma razão $[\text{PpcA}]/[\text{AuNP}]$ de 400. Assim, com menor quantidade de nanopartículas em solução relativamente à proteína, a maior parte da PpcA estará na forma livre. Desta forma, se os sinais que na presença de maior quantidade de nanopartículas apresentam desdobramento continuarem a apresentar o mesmo perfil quando a quantidade de nanopartículas é diminuída, então a interacção é sempre fraca, qualquer que seja a quantidade de AuNP.

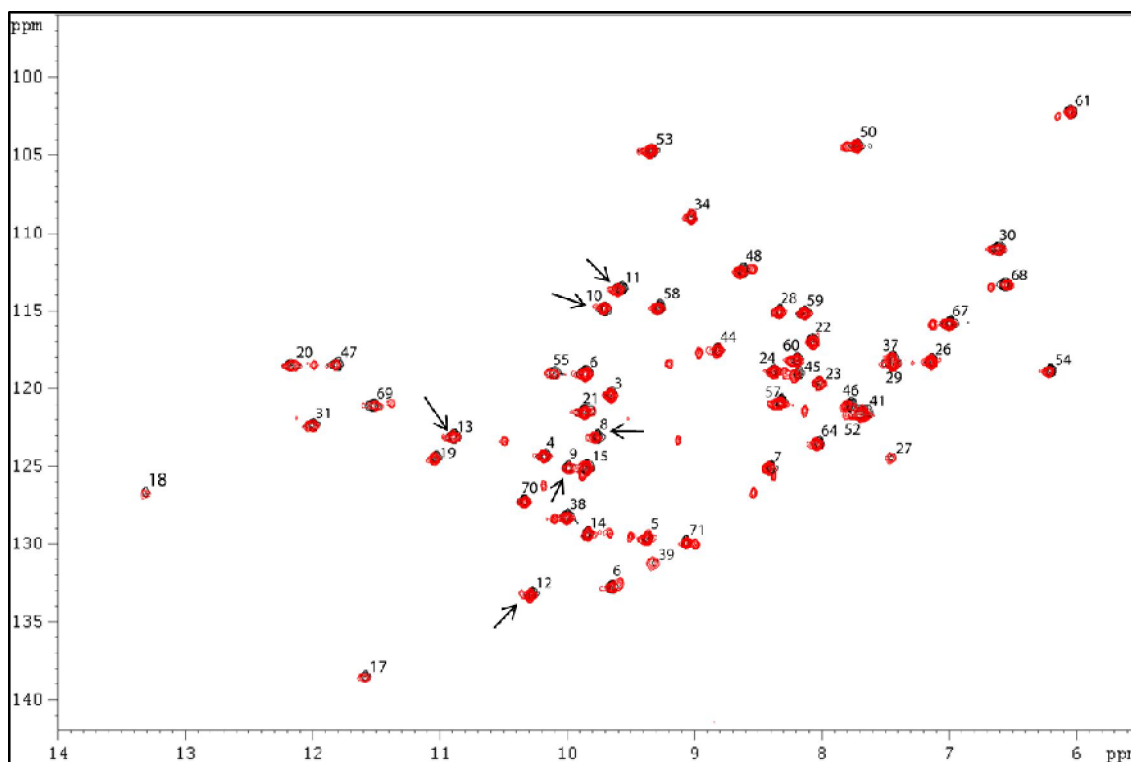


Fig. 3.21 – Espectro de RMN 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC da PpcA (preto) e dos bionanoconjugados de razão $[\text{PpcA}]/[\text{AuNP}]$ igual a 400 (vermelho), a 25°C e pH 8.

Analisando o espectro apresentado na figura 3.21 pode verificar-se que com uma menor concentração de nanopartículas, os sinais (assinalados com setas) que no espectro dos bionanoconjugados da figura 3.19 apresentavam um desvio da sua posição, neste caso apresentam-se desdobrados. Assim, pode-se dizer que estes sinais correspondem a duas populações em solução, a PpcA livre e a PpcA conjugada. De facto, na presença de uma menor quantidade de nanopartículas, a quantidade de proteína conjugada é também menor, sendo possível observar sinais correspondentes à forma livre e conjugada.

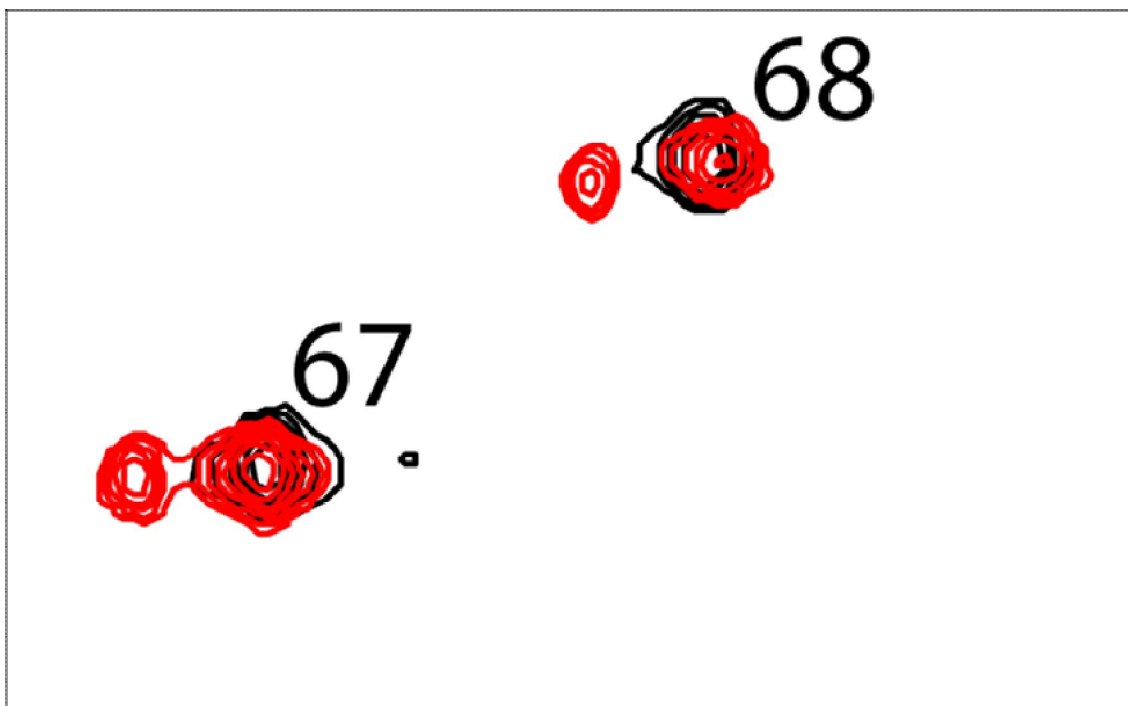


Fig. 3.22 – Secção do espectro 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC da PpcA (preto) e dos bionanoconjugados de razão $[\text{PpcA}]/[\text{AuNP}]$ igual a 400 (vermelho), a 25°C e pH 8.

Como se pode ver pelo espectro apresentado na figura 3.22, os sinais correspondentes dos resíduos glutamato-67 e cisteína-68, no espectro dos bionanoconjugados aparecem desdobrados, tal como acontecia nos bionanoconjugados com maior concentração de nanopartículas (Figura 3.20), indicando que efectivamente a interacção destes resíduos com a superfície das AuNP é mais fraca comparativamente com os resíduos 8-13 pois, independentemente da quantidade de AuNP na solução, estes sinais aparecem sempre desdobrados, o que não acontece com os resíduos 8-13 que só aparecem desdobrados quando a quantidade de nanopartículas é menor (Figura 3.21).

Com base nos resultados obtidos por espectroscopia de RMN foi possível identificar as zonas da estrutura da PpcA que contactam com as nanopartículas de ouro (Figura 3.23).

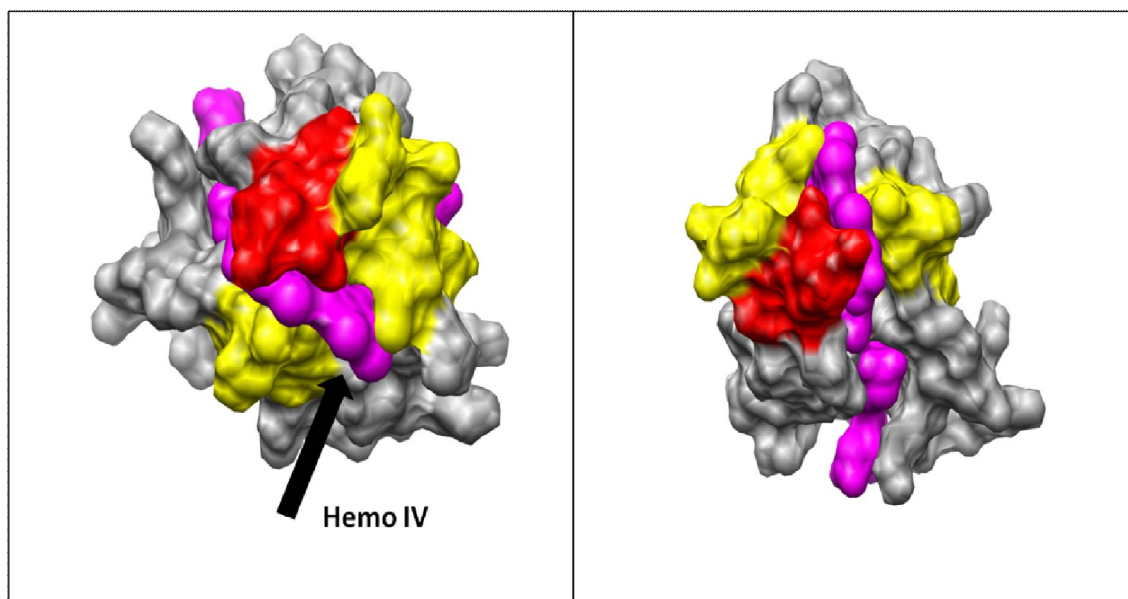


Fig. 3.23 – Esquemas representativos da superfície da PpcA, coloridos de acordo com o contacto entre esta e a nanopartícula: vermelho – zona de maior contacto; amarelo – zona de menor contacto; rosa – grupo hemo; e cinzento - zonas sem contacto. Estrutura retirada do PDB (código de acesso 2LDO) e preparada utilizando o software Chimera (UCSF, San Francisco, EUA). A figura da direita é uma rotação de 180° relativamente à figura da esquerda.

Como se pode observar pela figura 3.23 a interacção entre a PpcA e as nanopartículas é específica, ocorrendo apenas numa zona restrita da proteína. A zona a vermelho corresponde à zona onde o contacto com a nanopartícula é mais forte (resíduos 8-13) e a zona a amarelo indica uma interacção mais fraca (resíduos 44 a 48 e 67 a 71).

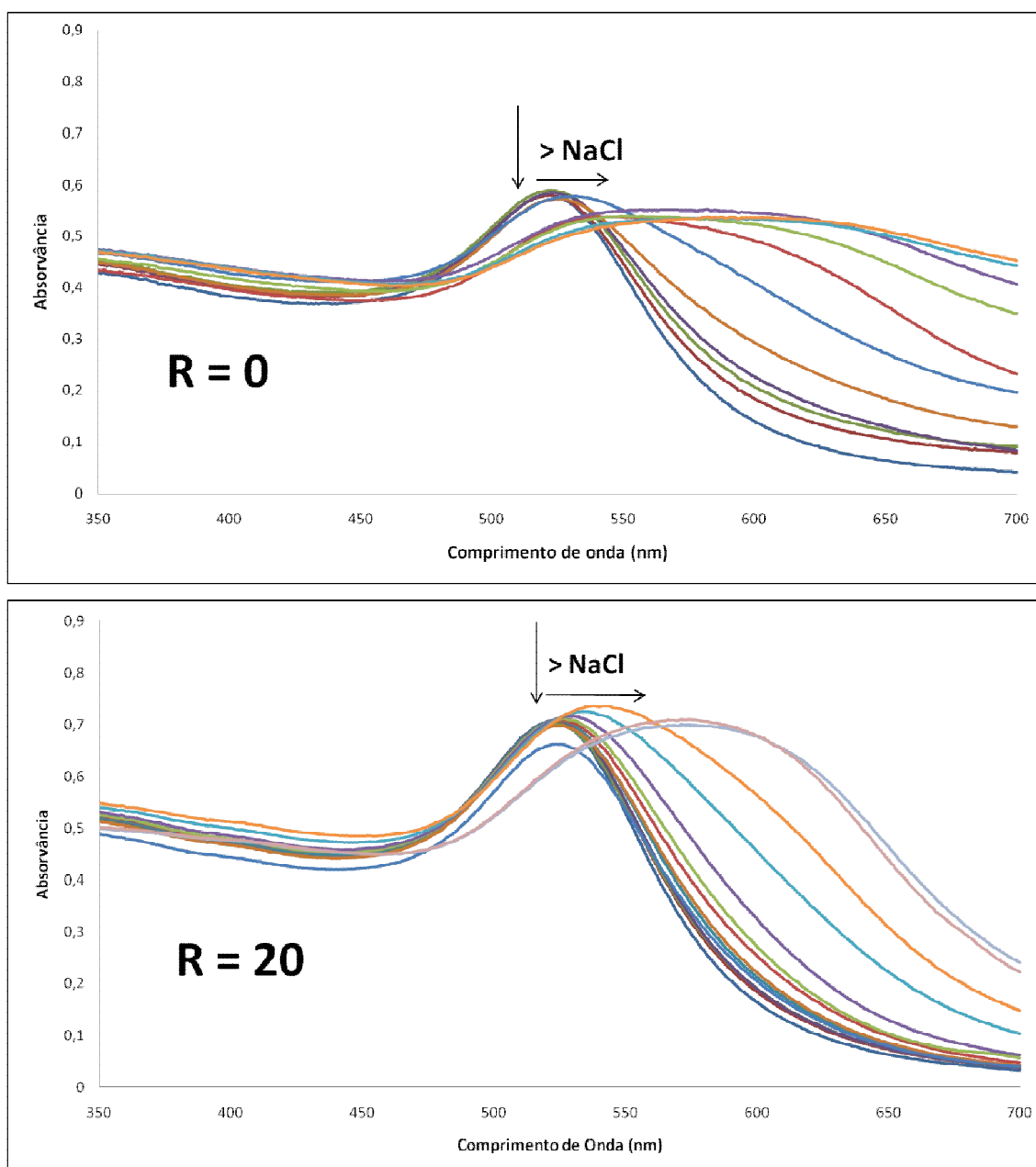
As zonas de contacto determinadas através dos espectros bidimensionais também estão de acordo com aquelas determinadas através dos espectros unidimensionais (figura 3.18), uma vez que os resíduos envolvidos na ligação se encontram também na vizinhança do hemo IV.

3.4 Estudo da estabilidade dos bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA

3.4.1 Estabilidade dos bionanoconjugados a diferentes concentrações de NaCl

Sabendo que a estabilidade das AuNP-MUA é fortemente dependente da força iónica da solução fez-se também este estudo para bionanoconjugados, com AuNP-MUA 3 nM, para diferentes razões [PpcA]/[AuNP-MUA] com concentrações de NaCl crescentes e ajustadas a cada uma das razões, de modo a obter um comportamento semelhante entre todas razões, nomeadamente uma gama de concentrações de NaCl em que os bionanoconjugados não agregavam nas concentrações de NaCl iniciais e que agregariam progressivamente à medida que a concentração de NaCl ia aumentando na solução.

Na figura 3.24 apresentam-se os espectros de UV/Visível de bionanoconjugados, de diferentes razões $[PpcA]/[AuNP-MUA]$, para concentrações de NaCl crescentes.



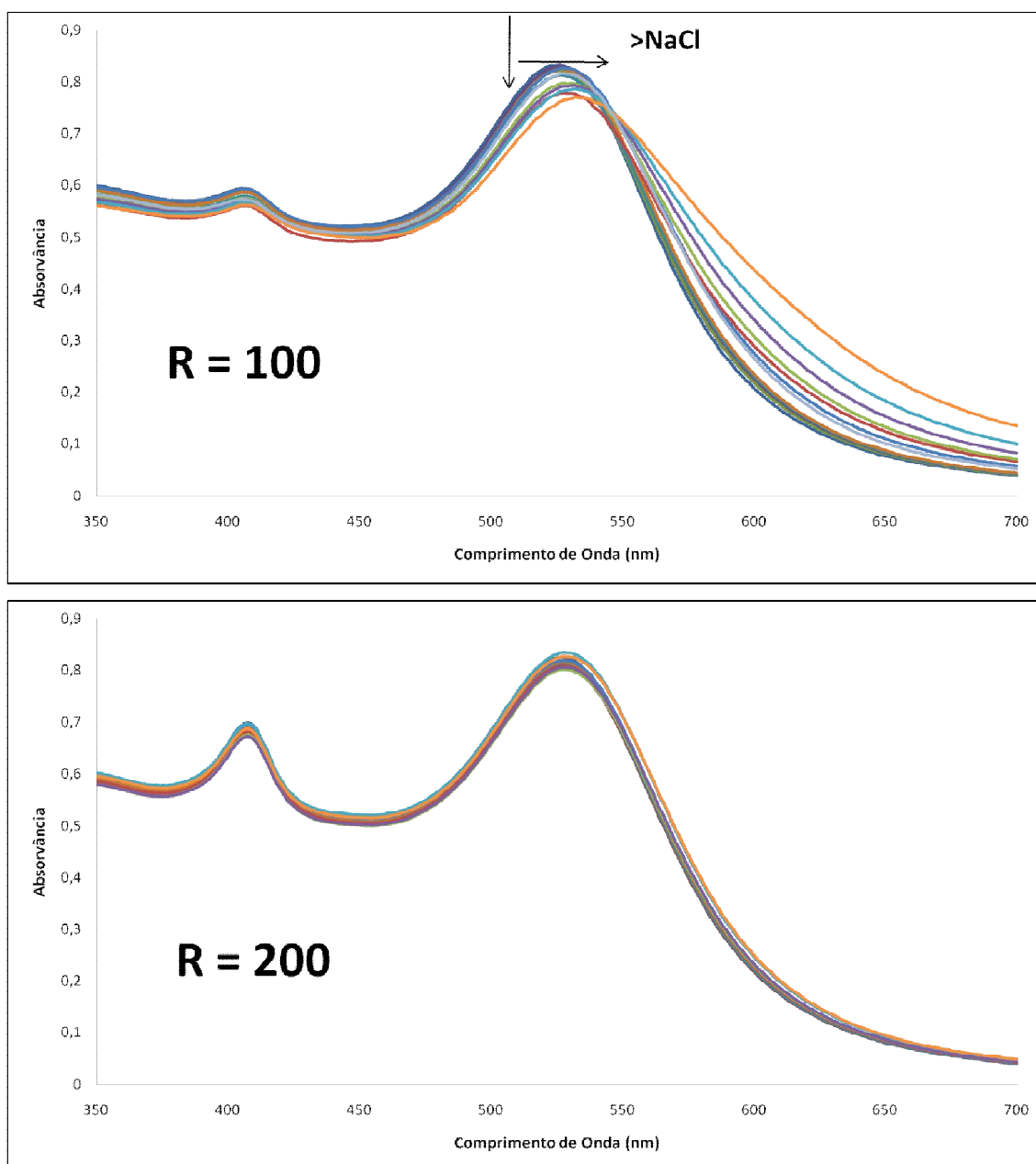


Fig. 3.24 - Espectros de UV/Visível de bionanoconjugados (com 3 nM de AuNP-MUA), com diferentes razões $R = [\text{PpcA}]/[\text{AuNP-MUA}]$, a diferentes concentrações de NaCl.

Analisando os espectros de UV/Visível apresentados na figura 3.24 e na figura 7.3, apresentada no Apêndice II, pode-se observar que o comportamento dos espectros, quando ocorre a agregação, é semelhante às AuNP-MUA sozinhas, pois a plasmônica sofre um desvio, absorvendo comprimentos de onda mais elevados. Pode-se observar também que à medida que aumenta a quantidade de PpcA nos bionanoconjugados, estes se tornam mais resistentes à agregação induzida pelo NaCl. Para ocorrer este tipo de agregação é necessário adicionar, aos bionanoconjugados, maiores quantidades de NaCl. Contudo, com $R = 200$, não foi possível induzir agregação, até à concentração de 1 M de NaCl.

Para avaliar melhor o perfil de agregação destes conjugados de diferentes razões [PpcA]/[AuNP-MUA] calcularam-se as razões de agregação, de forma análoga à anteriormente apresentada, utilizando os valores de absorvância ao comprimento de onda em que a absorvância é máxima para a forma totalmente agregada e o comprimento de onda em que a absorvância é máxima para a forma não agregada ou estável. O cálculo das razões de agregação foi efectuado para todas as concentrações de NaCl em todas as diferentes razões de bionanoconjugados, mantendo sempre os valores de comprimento de onda aos quais se mede a absorvância, a 600 nm para a forma totalmente agregada e 520 nm para a forma não agregada, de forma a permitir a comparação directa dos perfis de agregação dos bionanoconjugados de diferentes razões [PpcA]/[AuNP-MUA].

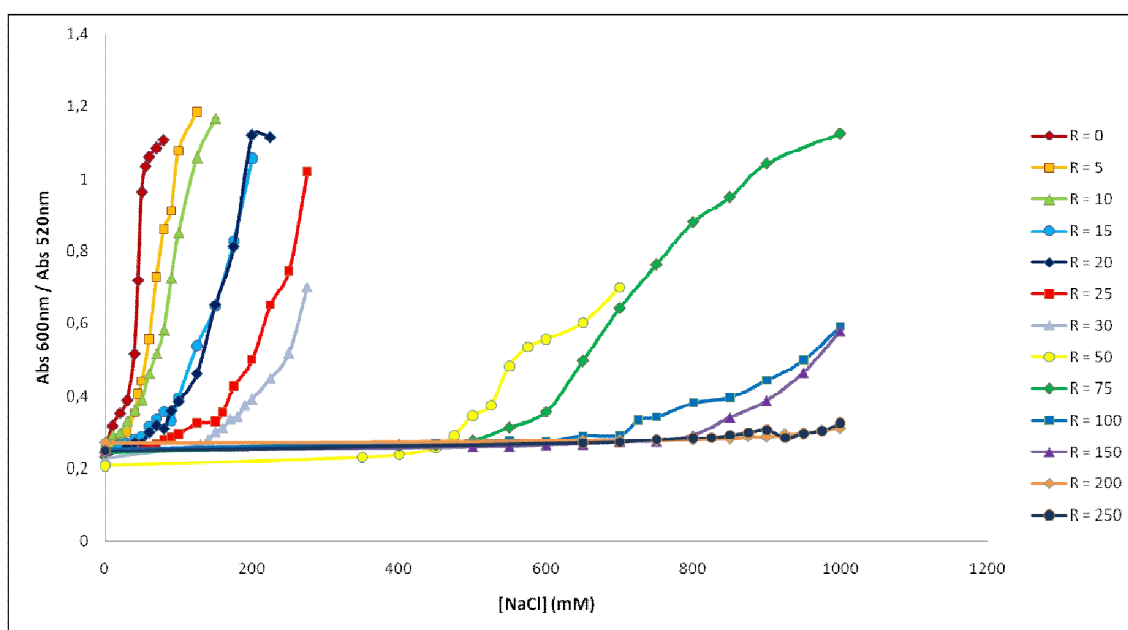


Fig. 3.25 - Gráfico das razões de agregação dos bionanoconjugados (3 nM de AuNP-MUA), de diferentes razões [PpcA]/[AuNP-MUA], em função da concentração de NaCl.

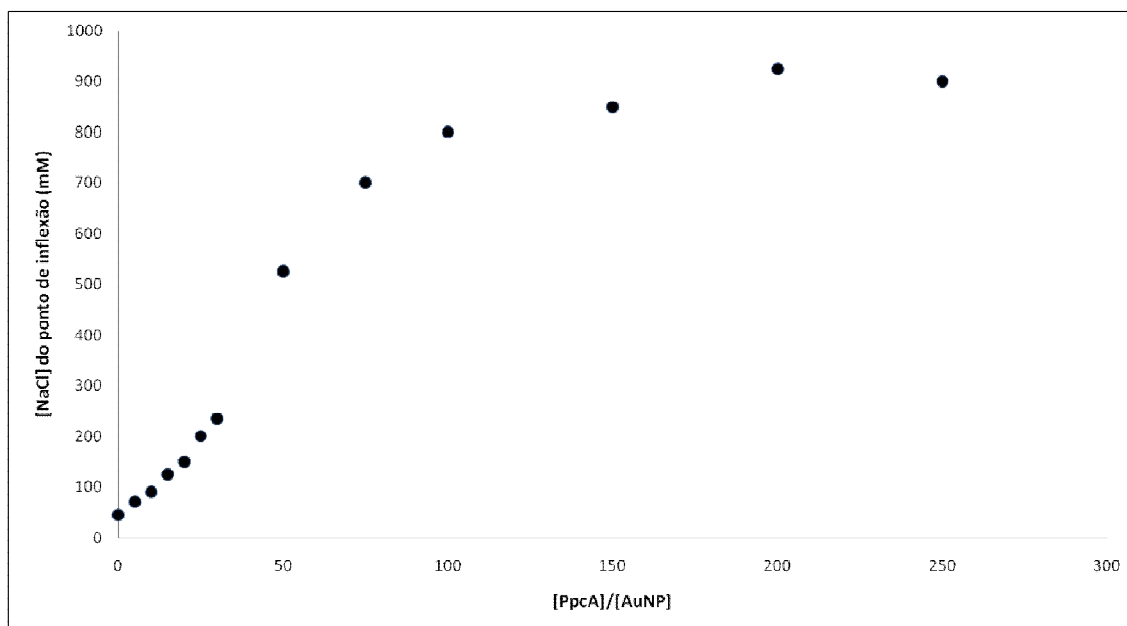


Fig. 3.26 – Gráfico dos pontos de inflexão das curvas de agregação em função da razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$.

Analisando o gráfico apresentado na figura 3.25 pode-se observar que, de facto, a agregação induzida pela adição de NaCl à solução de bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA tem um comportamento diferente e depende da razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$. Pode-se ver também pela figura 3.26 que a concentração de NaCl necessário para induzir a agregação, ponto de inflexão da curva de agregação, também é dependente da razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$. Destas representações torna-se evidente que para razões $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ mais elevadas, é necessária uma quantidade de NaCl maior para induzir agregação dos bionanoconjugados, corroborando as conclusões anteriores.

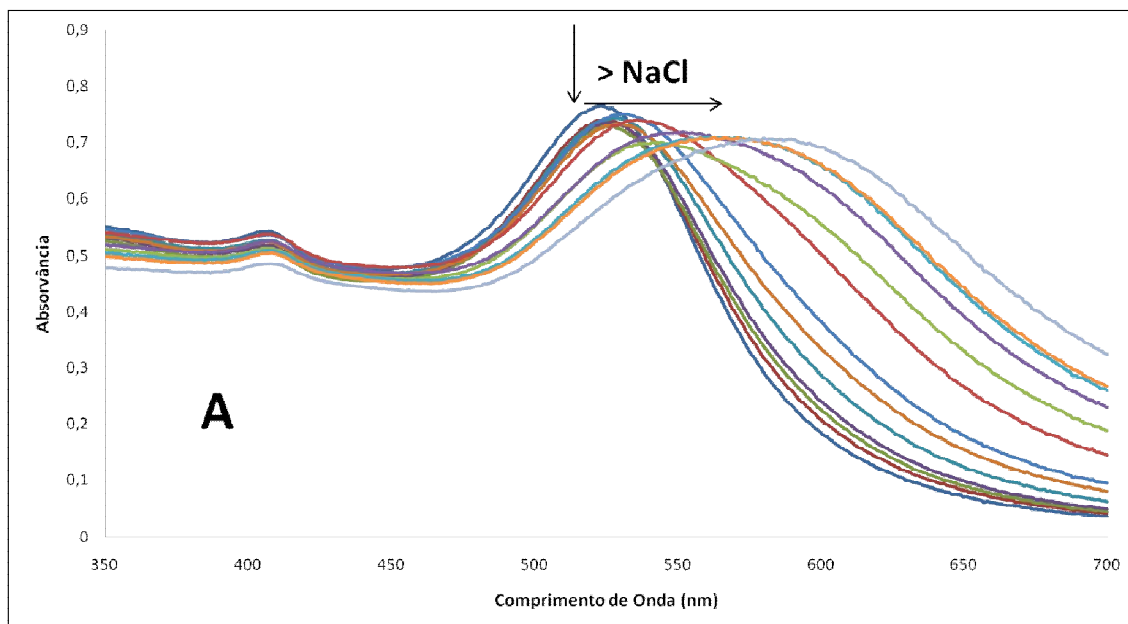
Tal efeito ocorre devido à PpcA, que ao conjugar com as nanopartículas, expõe vários resíduos ao solvente aquoso. Assim, na superfície dos bionanoconjugados, ter-se-á a face da PpcA que não conjuga com a nanopartícula mas que conterá, certamente, vários resíduos carregados que irão ser facilmente solvatados. Com a adição de NaCl, os iões Na^+ e Cl^- irão não só neutralizar os resíduos superficiais carregados da PpcA, como também competir pela solvatação com os bionanconjugados, sendo que ao atingirem uma determinada concentração de iões, esta será elevada o suficiente para impedir fortemente a solvatação dos bionanconjugados, ocorrendo a agregação. No entanto, à medida que a concentração de PpcA aumenta nos bionanoconjugados, irão existir cada vez mais resíduos expostos e mais dificilmente se induz a agregação, necessitando de adicionar maiores quantidades de NaCl.

Na razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ 200 e na razão 250, observa-se que não existe agregação dos bionanoconjugados, até concentrações de NaCl de 1 M, isto acontece pois a quantidade de PpcA nestes bionanoconjugados é suficiente para os proteger totalmente da agregação.

3.4.2 Estabilidade à agregação por NaCl dos bionanoconjugados ao longo do tempo

Após o estudo da estabilidade dos bionanoconjugados com diferentes razões $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ a diferentes concentrações de NaCl, fez-se também um estudo análogo em que se determinou diferenças na estabilidade dos bionanoconjugados com diferentes tempos de conjugação. Prepararam-se 6 conjugados, de razão $[PpcA]/[AuNP-MUA] = 75$, e procedeu-se ao estudo da estabilidade a diferentes concentrações de NaCl após 1, 2, 3, 8, 15 e 30 dias. Este estudo foi feito com os bionanoconjugados de razão 75 pois a esta razão $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ há efeito de agregação observável a valores de concentração de NaCl intermédios na gama estudada (consultar figura 3.25).

Na figura 3.27 e na figura 7.4 (no Apêndice II) apresentam-se os espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados de razão 75 com diferentes concentrações de NaCl e com diferentes dias de conjugação.



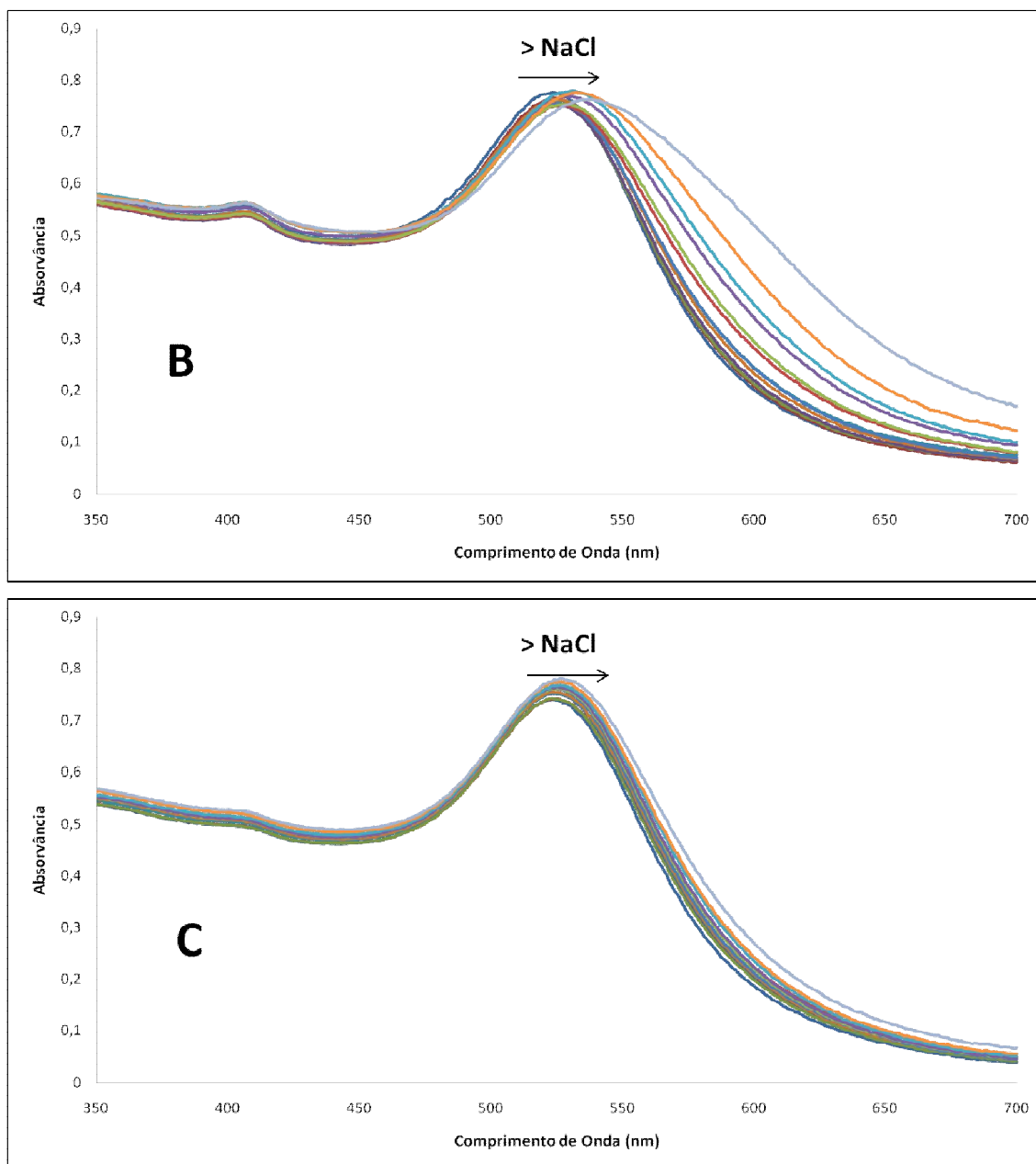


Fig. 3.27 – Espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados de razão 75, com 1 (A), 8 (B) e 30 (C) dias de conjugação, a diferentes concentrações de NaCl.

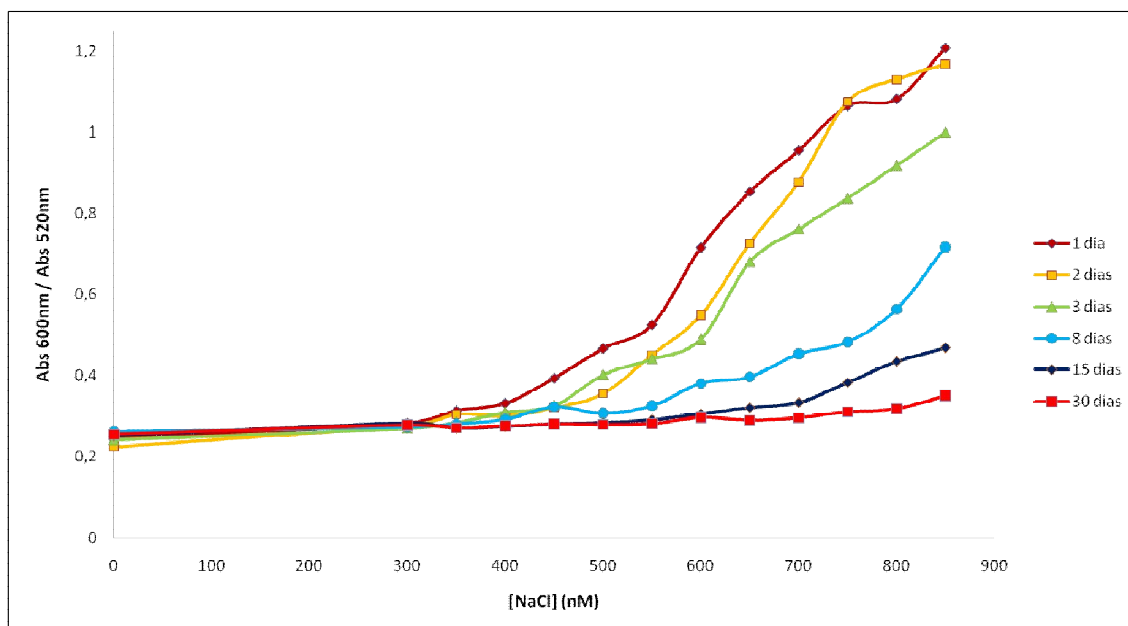


Fig. 3.28 – Gráfico da de agregação dos bionanoconjugados (3 nM de AuNP-MUA) de razão $[PpcA]/[AuNP-MUA] = 75$ com diferentes dias de conjugação, em função da concentração de NaCl.

Ao analisar os espectros apresentados nas figuras 3.27, 3.28 e 7.4, esta última apresentada no Apêndice II, pode-se verificar que apesar de as concentrações de NaCl adicionadas à solução de bionanoconjugados serem as mesmas, nos diferentes dias, a agregação destes não se dá de forma idêntica.

Pode-se observar que à medida que o tempo de conjugação é maior a agregação é menor, sendo que após 15 e 30 dias de conjugação, praticamente não existe agregação comparativamente com a conjugação de 1 dia. Este efeito pode ser explicado devido a um aumento da adsorção da PpcA à superfície das AuNP-MUA ao longo do tempo, indicando que a cinética de conjugação é lenta e com o passar do tempo as AuNP-MUA ficam cada vez mais revestidas com PpcA de forma a formar uma “coroa” compacta na superfície das partículas, tornando a agregação com NaCl mais difícil de ocorrer.

Outro aspecto importante que indica que existe uma maior conjugação ao longo do tempo é o facto da banda de Soret ir diminuindo com o tempo de conjugação (Figura 3.29).

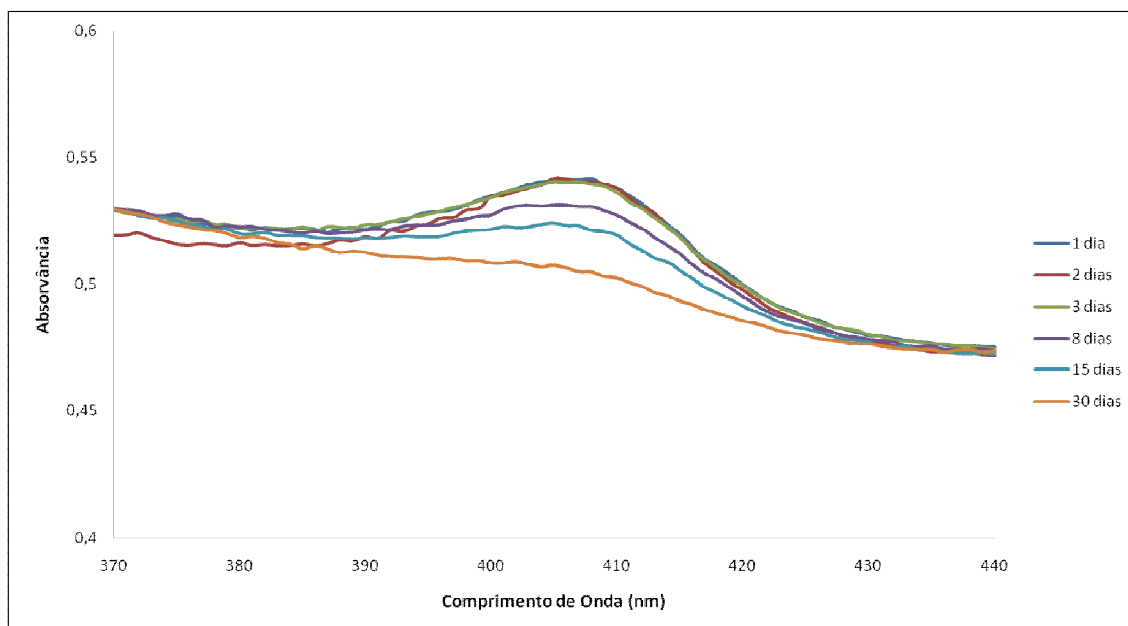


Fig. 3.29 – Espectros da banda de Soret dos bionanoconjugados com diferentes tempos de agregação.

Analisando a figura 3.29 pode-se ver que a banda de Soret, nos bionanoconjugados, vai diminuindo a sua amplitude à medida que o tempo de conjugação é maior e nos bionanoconjugados com 30 dias de conjugação, esta banda praticamente não está definida.

Tal como referido anteriormente, a diminuição da banda de Soret é característica da conjugação da PpcA com as nanopartículas, devido à interacção entre estas duas espécies, em que deixa de haver tanta PpcA disponível na solução para absorver a radiação, levando à diminuição da intensidade da banda de Soret.

Verificou-se também se a banda da plasmónica sofria alterações durante o tempo em estudo.

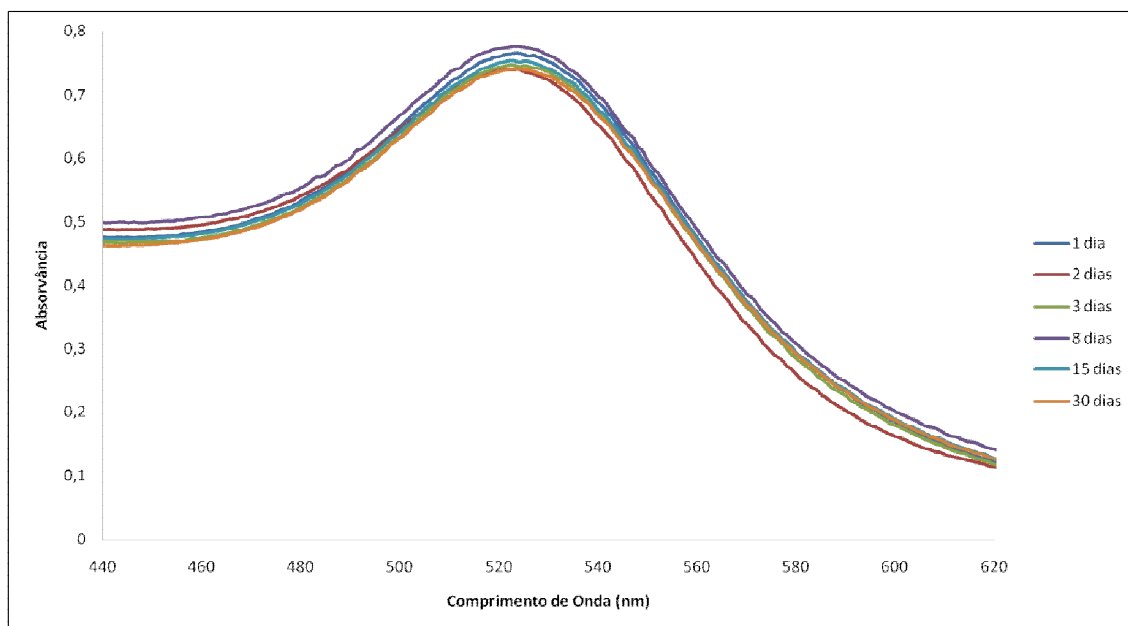


Fig. 3.30 – Espectros da banda da plasmônica dos bionanoconjugados com diferentes tempos de conjugação.

Por análise da figura 3.30 pode concluir-se que a banda da plasmônica não sofre alterações significativas ao longo dos tempos de conjugação estudados, o que indica estabilidade dos bionanoconjugados, por si só, durante 30 dias.

3.4.3 Estabilidade dos bionanoconjugados a diferentes valores de pH

Sabendo que a estabilidade de uma solução de nanopartículas de ouro depende do pH do meio, fez-se também o estudo da estabilidade dos bionanoconjugados com uma razão de $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ igual a 200, para uma concentração de AuNP-MUA de 3 nM, a diferentes valores de pH. O acerto de pH foi feito de duas formas distintas, fez-se o acerto de forma lenta, ou seja foram adicionados pequenos volumes de base ou de ácido, de forma a que o valor de pH mudasse de forma lenta e gradual; foi também feito o acerto de pH adicionando directamente o volume necessário, de base ou de ácido, para que o pH tome rapidamente o valor desejado.

Na figura 3.31 estão apresentados os espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados a diferentes valores de pH, acertados de forma lenta.

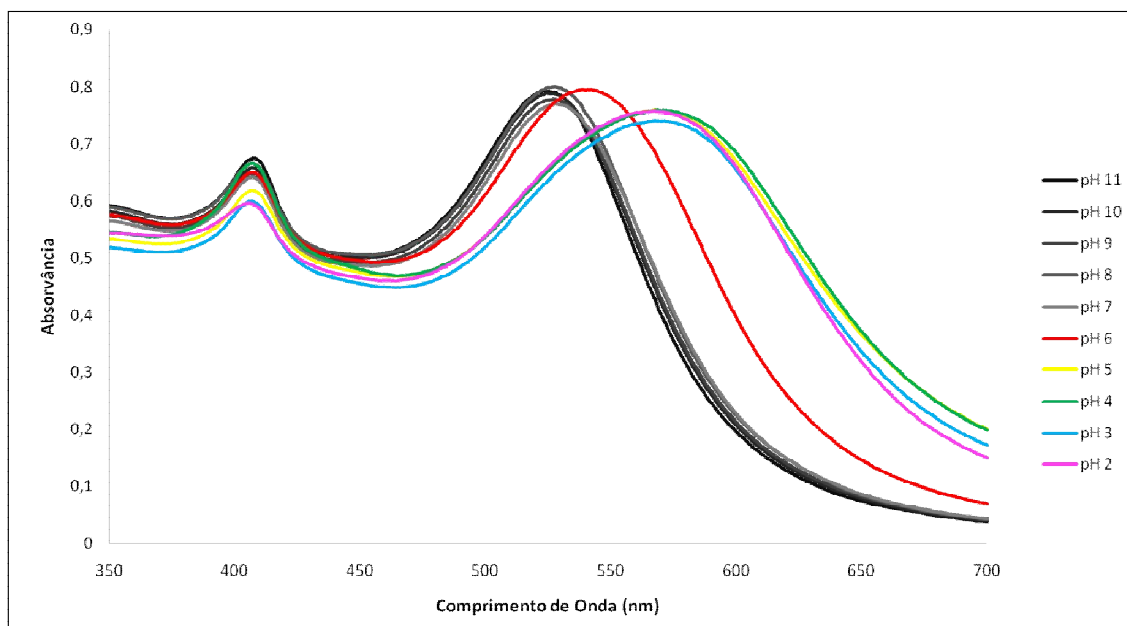


Fig. 3.31- Espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados ($R = 200$) de PpcA e AuNP-MUA (3 nM em AuNP) a diferentes valores de pH (não agregação representada em escala cinza; agregação representada com cor), acertados de forma lenta.

Por análise da figura 3.31 observa-se que, tal como nas nanopartículas sozinhas, o pH da solução é muito importante para a estabilidade dos bionanoconjugados. Nos casos em que ocorre agregação a banda da plasmónica sofre um desvio para a zona do vermelho, no espectro. A plasmónica passa de 525 nm, na forma não agregada, para cerca de 600 nm, pois as nanopartículas ao agregarem comportam-se como partículas de maiores dimensões, absorvendo a comprimentos de onda maiores.

Nota-se também que para o espectro a pH 2 existe uma ligeira alteração da banda de Soret da PpcA. Esta alteração tem causas conhecidas, acontecendo devido a uma transição que ocorre nos grupos hemo, dos citocromos do tipo c, a este pH em que há uma perda da estabilidade destes, perdendo, o grupo hemo, um dos seus ligandos, de azoto, cedido pelos resíduos de histidina devido a alterações na conformação da proteína devido à repulsão intramolecular causada pela elevada carga global positiva, a este pH¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

De forma a determinar se as alterações espectrais dos bionanoconjugados se devem, de facto, à agregação das nanopartículas e não a alterações do espectro da PpcA aos diferentes valores de pH, foi feito um controlo com os espectros UV/Visível da PpcA sozinha e à mesma concentração que foi utilizada nos bionanoconjugados, aos diferentes valores de pH utilizados neste estudo (Figura 3.32).

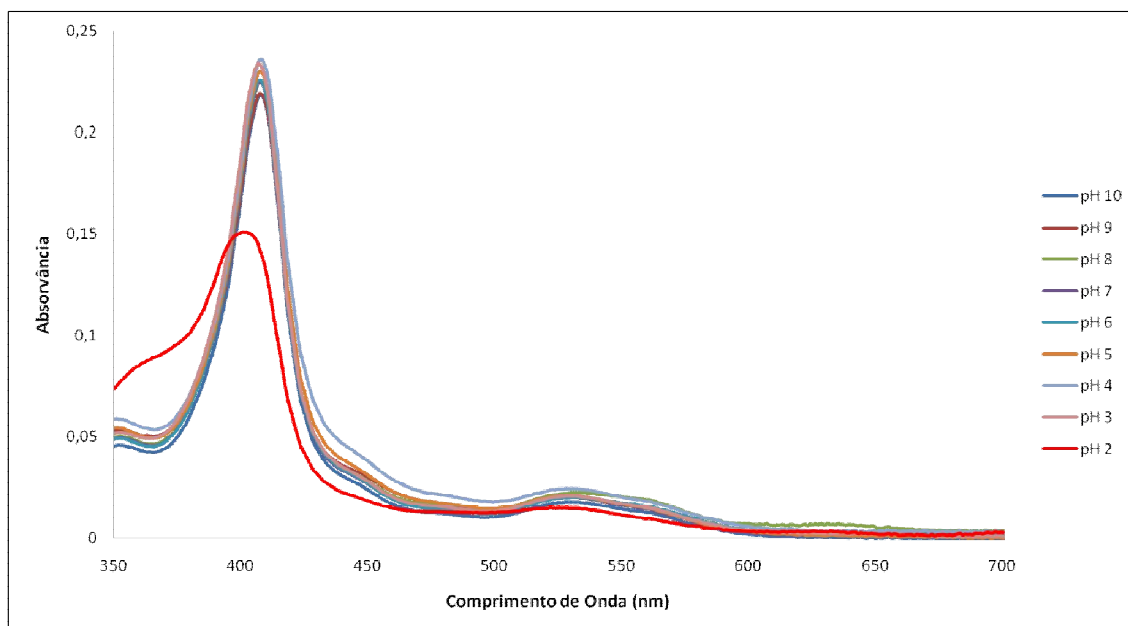


Fig. 3.32 – Espectros de UV/Visível da PpcA a 600 nM a diferentes valores de pH.

Observando o gráfico apresentado na figura 3.32 pode-se ver que o espectro da PpcA não sofre alterações para valores de pH entre 10 e 3, mas a pH 2 ocorre claramente uma distorção da banda de Soret, devido à perda de estabilidade da estrutura da proteína, a este pH devido à repulsão intermolecular dos resíduos altamente carregados positivamente, causando a perda de um dos ligandos de azoto do grupo hemo¹⁰⁸⁻¹¹⁰, no caso da PpcA, cedido por resíduos de histidina³⁶.

Para compreender melhor o perfil de agregação dos bionanoconjugados com o pH, calcularam-se as razões de agregação para cada valor de pH. O cálculo das razões de agregação foi feito de maneira idêntica à anteriormente descrita, utilizando os comprimentos de onda de 600 nm para a forma totalmente agregada e 520 nm para a forma não agregada ou estável.

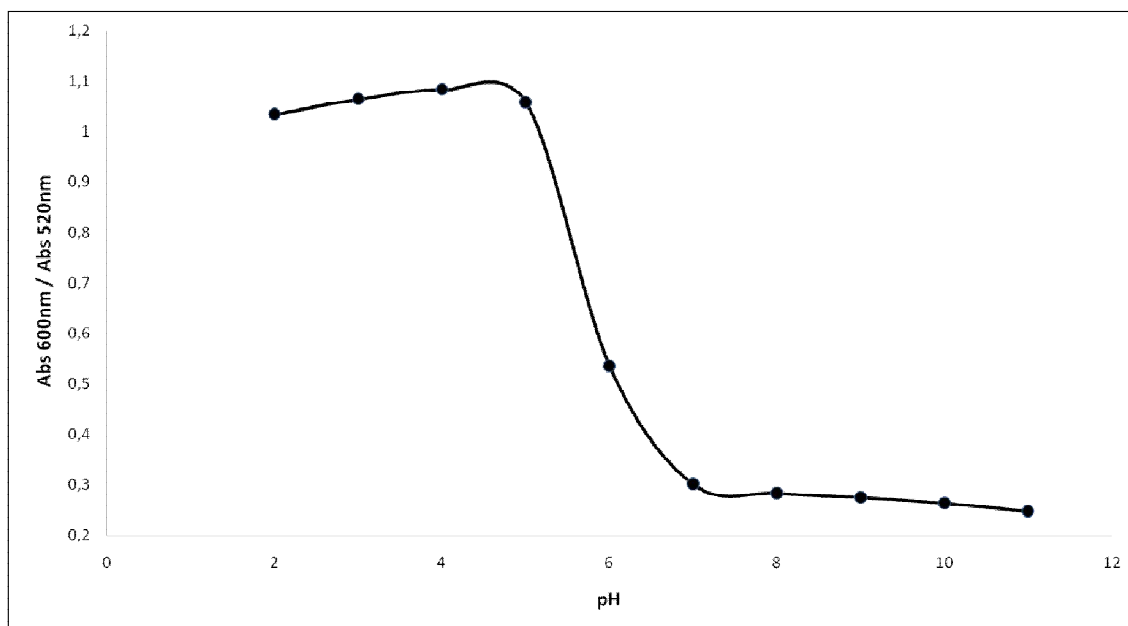


Fig. 3.33 – Gráfico das razões de agregação dos bionanoconjugados (R= 200) de PpcA e AuNP-MUA (3 nM em AuNP) em função do pH.

Ao observar o gráfico da figura 3.33 denota-se que existem duas espécies diferentes em solução cuja predominância é dependente do valor de pH. A valores de pH iguais ou superiores a 7, a espécie não agregada é predominante em solução enquanto a valores de pH mais baixos, menores que 6, é a espécie agregada que predomina. A pH 6 a solução de bionanoconjugados parece estar numa zona intermédia de agregação.

Como dito acima, também foi feito estudo da estabilidade a diferentes valores de pH mas para bionanoconjugados cujo valor de pH foi acertado de forma brusca. Na figura 3.34 apresenta-se os espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados a diferentes valores de pH, acertados de forma brusca.

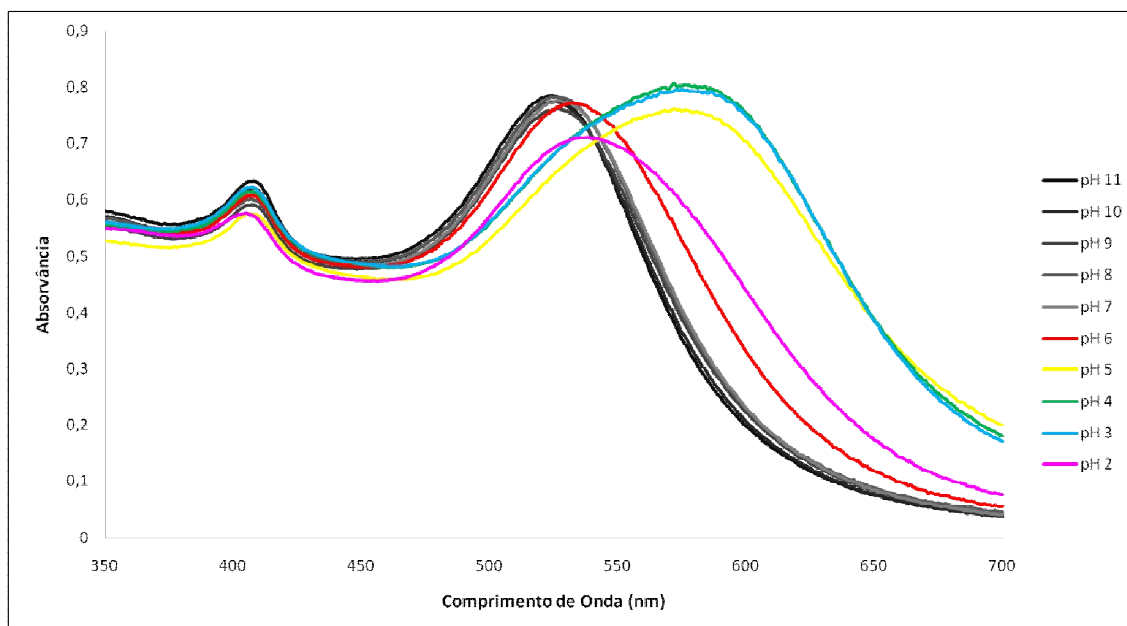


Fig. 3.34 – Espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados ($R = 200$) de PpcA e AuNP-MUA (3 nM em AuNP) a diferentes valores de pH (não agregação representada em *greyscale*; agregação representada com cor), acertados de forma brusca.

Ao analisar a figura 3.34 observa-se que o comportamento dos espectros nos diferentes valores de pH é muito semelhante aos da figura 3.31, exceptuando no espectro a pH 2. A este valor de pH, quando é acertado de forma brusca, parece que a agregação não é tão forte como a pH 5, 4 e 3. Isto acontece, possivelmente, devido a ocorrer libertação da proteína nos bionanoconjugados, quando se altera bruscamente o pH para este valor. Assim, a proteína livre forma uma malha polimérica impedindo que as nanopartículas agreguem.

Para tentar perceber melhor o efeito do tempo na agregação dos bionanoconjugados pelo pH, fizeram-se os espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados 6 horas após o acerto de pH de forma brusca (Figura 3.35).

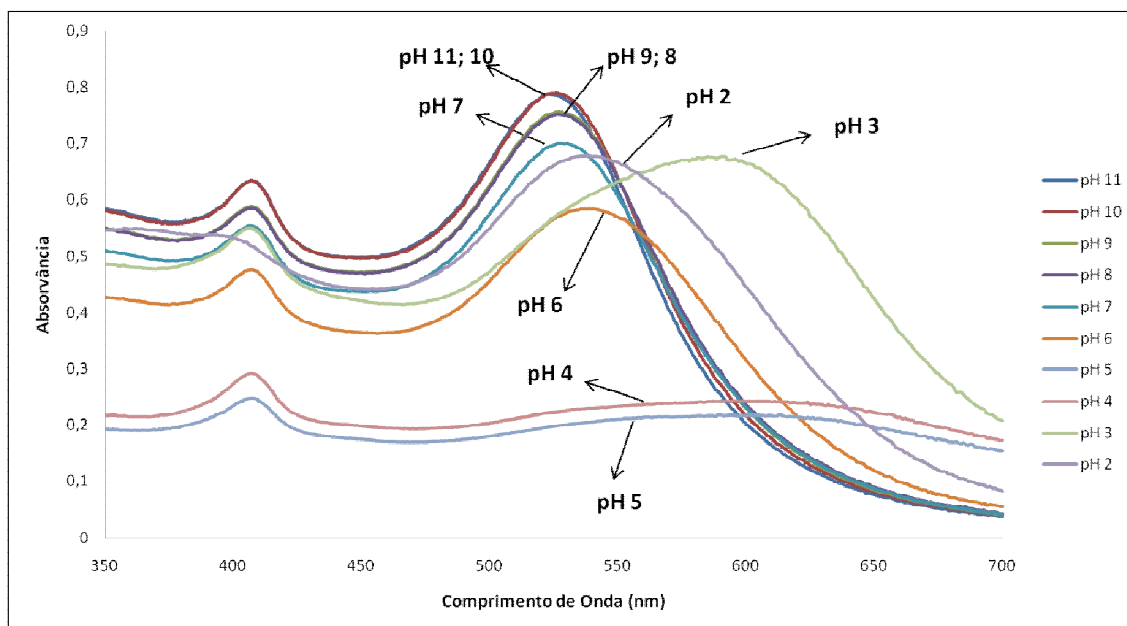


Fig. 3.35 – Espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados a diferentes valores de pH, 6 horas após o acerto de pH de forma brusca.

Observando a figura 3.35, nota-se claramente diferenças entre os espectros dos bionanoconjugados 6 horas depois do acerto de pH. A pH 10 e 11 não ocorreram quaisquer alterações nos espectros, no entanto a pH 9 e 8 a plasmônica sofreu um pequeno desvio e houve uma ligeira diminuição de intensidade de todo o espectro, indicando talvez alguma precipitação dos bionanoconjugados. Esta situação é mais evidente a pH 7 e 6, onde ocorreu uma maior diminuição da intensidade do espectro apesar de não aumentar a agregação, tal como comprovado pela banda plasmônica. A pH 4 e 5, onde inicialmente se observava uma maior agregação, houve uma grande diminuição da intensidade do espectro indicando que ocorreu uma precipitação quase total dos bionanoconjugados, 6 horas após o acerto do pH. A pH 3 observa-se que ocorreu alguma precipitação dos bionanoconjugados mas em menor extensão do que aos valores de pH 4 e 5. A pH 2 verificou-se que a banda de Soret desapareceu totalmente devido à perda de estabilidade da proteína devido a alterações conformacionais na estrutura da biomolécula provocadas pela carga global, muito positiva, a este pH¹⁰⁸⁻¹¹⁰ e tal como a pH 3 não parece ter havido grande ocorrência de precipitação dos bionanoconjugados pois não se observou diminuição da intensidade do espectro. Esta observação pode ser indicativa do anteriormente referido, que a estes dois valores de pH, muito ácidos, pode ocorrer libertação da proteína dos bionanoconjugados, formando uma malha polimérica protegendo assim as nanopartículas de agregarem e precipitarem.

Assim, conclui-se que os bionanoconjugados de PpcA com AuNP-MUA são estáveis a valores de pH iguais ou superiores a 7, sendo que podem apresentar alguma precipitação, especialmente a pH 7. No entanto, a valores superiores ao pl da PpcA (9,44)^{36,39},

nomeadamente a pH 11 os bionanoconjugados são bastante estáveis e que, em princípio, se poderão manter assim durante vários dias.

3.5 Actividade da PpcA na Detecção Electroquímica de Cromato

3.5.1 Estudos das propriedades electroquímicas do eléctrodo nanoestruturado de FTO-Au

Na figura 3.36 está representada o voltamograma referente à electrodeposição de ouro na superfície do eléctrodo de FTO.

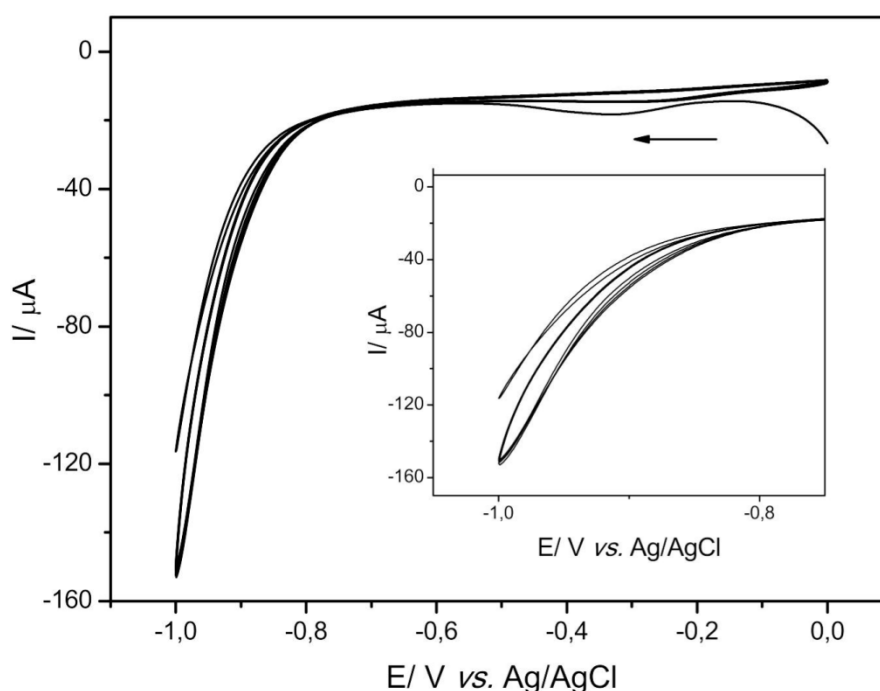


Fig. 3.36 – Electrodeposição de ouro sobre o eléctrodo de FTO por voltametria cíclica com velocidade de 0,010 V/s. Inserida ampliação da região entre -0,75 V e -1,05 V.

Como se pode observar na figura 3.36, com o varrimento no sentido catódico gera-se uma corrente Faradaica que se inicia por volta dos -0,8 V e que, convencionalmente, foi interrompida a -1,0 V. Processos com potenciais redox inferiores a -1,0 V, utilizando água como solvente são pouco controláveis, podendo ocorrer a decomposição da água, por exemplo. Neste caso pode-se assumir que ocorre a redução de Au(III) para Au(0).

Pode-se ver uma onda com duas intensidades de corrente distintas por volta de -1,0 V, uma com corrente máxima de -120 μA e outra com uma corrente máxima de -157 μA. A primeira está relacionada com a primeira deposição de ouro sobre o eléctrodo de FTO, neste processo são gerados núcleos de ouro onde posteriormente serão depositados outros átomos de ouro. A segunda onda está relacionada com as deposições de ouro seguintes. Estas

deposições ocorrem após a primeira formação de núcleos de ouro e como tal em cada um dos ciclos é depositada a mesma quantidade de ouro pois a intensidade de corrente é a mesma em todas as deposições, sendo um processo linear.

Em estudos recentemente publicados¹¹¹ demonstram que este tipo deposição de ouro sobre eléctrodos gera nanoestruturas muito semelhantes a nanopartículas que apresentam um grande contacto eléctrico e uma grande interacção com o eléctrodo onde é depositado.

Existem diversas técnicas para comprovar a melhoria da condução eléctrica e consequente diminuição da resistência em eléctrodos modificados, desta forma, com ouro¹¹¹, sendo uma destas técnicas verificar a reversibilidade de uma reacção electroquímica padrão.

Na figura 3.37 está apresentado o processo de voltametria cíclica do composto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ onde é observado o processo redox de Fe(III)/Fe(II). Foi feita a voltametria cíclica utilizando o eléctrodo de FTO após a sua limpeza com solução piranha e o eléctrodo de FTO após a deposição de 5 camadas de ouro.

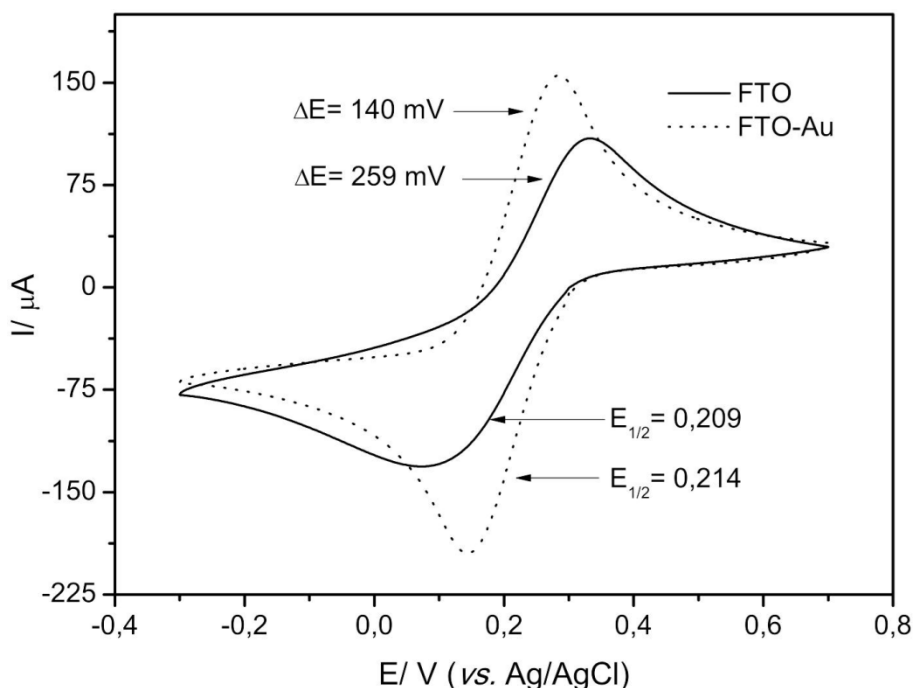


Fig. 3.37 – Voltametria cíclica de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mM utilizando um eléctrodo de FTO (linha contínua) e um eléctrodo de FTO após deposição de 5 camadas de ouro (linha picotada).

Como se pode observar pela figura 3.37 a diferença entre as ondas catódicas e anódicas é maior no eléctrodo de FTO sem deposição de ouro. A diferença entre o processo de redução e oxidação é de 259 mV no eléctrodo de FTO sem deposição de ouro, no entanto com a utilização do eléctrodo FTO-Au como eléctrodo de trabalho a diferença diminui para 140 mV. Além de se observar um aumento da reversibilidade do processo, observa-se também um aumento da área dos picos indicando assim um aumento da área superficial do eléctrodo de trabalho. Sendo a concentração do substrato electroactivo a mesma para ambos os casos e

que a área delimitada do eléctrodo é também a mesma, terá ocorrido uma mudança na estrutura do eléctrodo aquando da deposição de ouro. No caso da formação destas nanoestruturas, o resultado observado na figura 3.37, indica claramente a vantagem da utilização da nanopartículas de ouro nestes sistemas electroquímicos, devido ao aumento da área de contacto do eléctrodo por este possuir nanoestruturas à sua superfície.

3.5.2 Montagem do bionanoeléctrodo de FTO-Au-PpcA e estudo das suas propriedades electroquímicas

O estudo das propriedades electroquímicas da PpcA foi realizado com a PpcA dispersa numa solução aquosa e também com a PpcA imobilizada à superfície do eléctrodo FTO-Au. O processo de montagem do bionanoeléctrodo de FTO-Au-PpcA é ilustrado na figura 3.38.

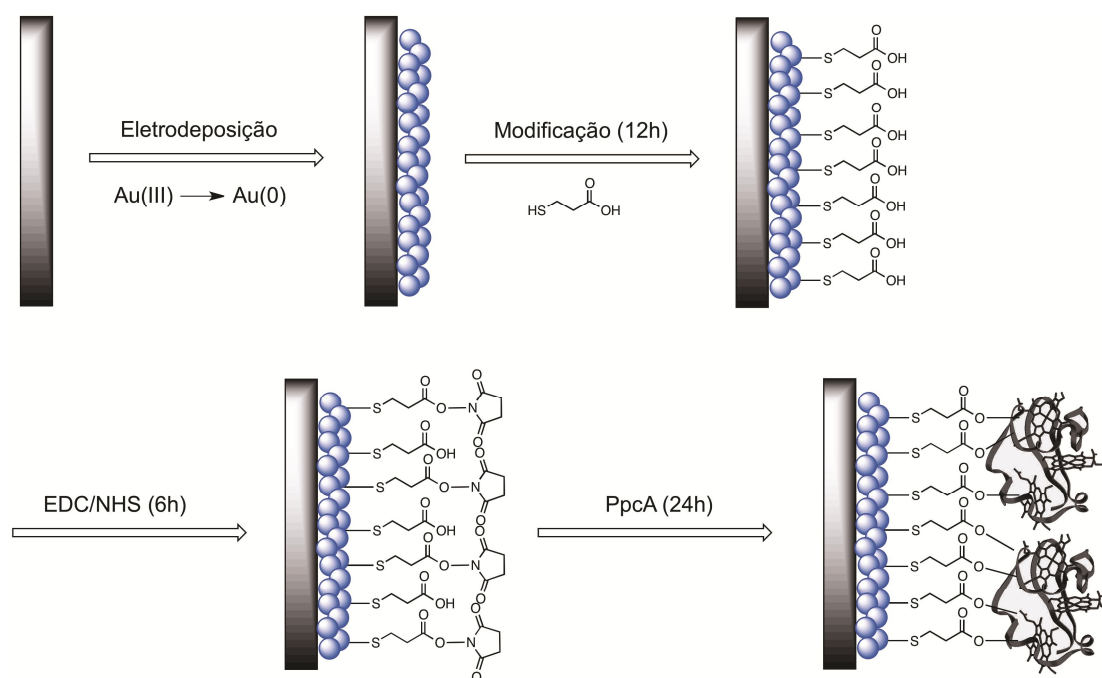


Fig. 3.38 – Esquema representativo do processo de montagem do bionanoeléctrodo.

A montagem do bionanoeléctrodo é iniciada pela electrodeposição de 5 camadas de ouro efectuada pelo método referido acima. Após a electrodeposição, o eléctrodo é modificado com ácido 3-mercaptopropanóico (MPA), que é um pequeno ácido carboxílico tiolado, tirando partido da grande afinidade do grupo sulfidrílo para o ouro e deixando o grupo carboxílico orientado para a solução. O eléctrodo modificado com MPA é então colocado numa solução contendo EDC/NHS que são agentes de reticulação que catalisam a formação de ligações covalentes entre os grupos carboxilo à superfície do eléctrodo e os grupos amina presentes nas cadeias laterais dos resíduos da PpcA¹⁰¹. O eléctrodo é então colocado numa solução de PpcA durante um intervalo de tempo adequado para possibilitar a imobilização da PpcA na

superfície do eléctrodo através da ligação covalente entre os grupos -COOH do MPA e dos grupos -NH₂ existentes na PpcA.

Cada uma das etapas pode ser acompanhada pela modificação do sinal electroquímico do composto K₃[Fe(CN)₆] utilizando voltametria cíclica. Na figura 3.39 estão apresentados os resultados da voltametria cíclica de K₃[Fe(CN)₆] utilizando como eléctrodos de trabalho o eléctrodo de FTO após a deposição de ouro, o eléctrodo de FTO-Au modificado com MPA e o bionanoeléctrodo FTO-Au-PpcA.

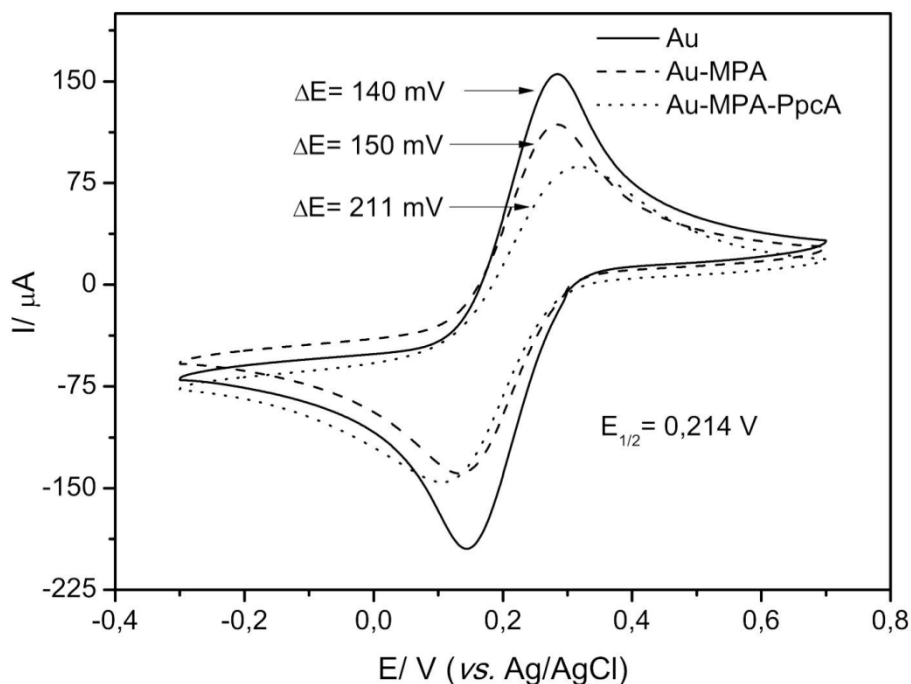


Fig. 3.39 – Voltametria cíclica de K₃[Fe(CN)₆] 5 mM utilizando o eléctrodo de FTO com 5 camadas de ouro (linha contínua), o mesmo eléctrodo após modificação com MPA (linha tracejada) e o eléctrodo após ligação da PpcA à sua superfície (linha picotada).

Observando a figura 3.39 pode-se constatar que o eléctrodo parece ter a sua condutividade diminuída, quando modificado com MPA e PpcA pois existe uma diminuição da reversibilidade do processo redox Fe(III)/Fe(II). A modificação com MPA denota uma ligeira diminuição na condutividade do eléctrodo, a diferença de potencial para o par redox Fe(III)/Fe(II) aumenta de 140 mV para 150 mV, isto acontece devido a moléculas orgânicas alifáticas apresentarem uma baixa condutividade comparativamente a metais ou compostos aromáticos e como tal a modificação da superfície do eléctrodo com esta molécula dificulta a transferência electrónica. O mesmo sucede com a PpcA que possui uma estrutura maior e mais volumosa que o MPA e diminuindo, de forma mais evidente, a condutividade do eléctrodo pois a diferença de potencial aumenta para 211 mV.

Este resultado não é a única prova da ligação da PpcA à superfície do eléctrodo. A PpcA, como já referido na “Introdução Teórica”, apresenta potenciais de redução muito

próximos (-154 mV para o Hemo I, -138 mV para o Hemo III e -125mV para o Hemo IV)³⁵, podendo ser detectado o sinal de redução através de voltametria cíclica (Figuras 3.40 e 3.41).

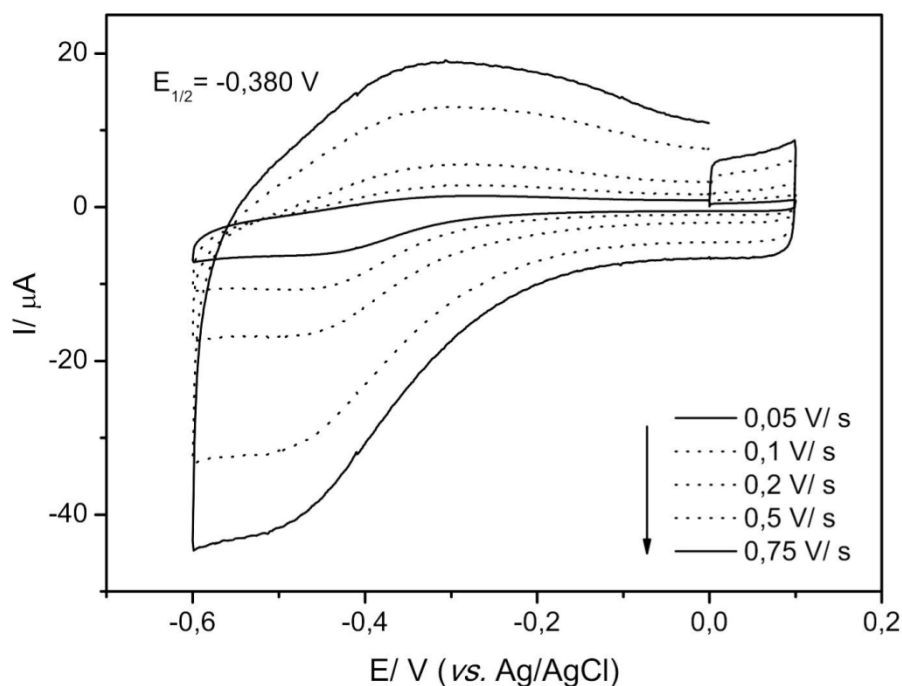


Fig. 3.40 - Voltametria cíclica da PpcA em solução aquosa com KNO_3 0,1 M e tampão fosfato 10 mM pH 7, utilizando o eléctrodo FTO-Au com diferentes velocidades de varrimento.

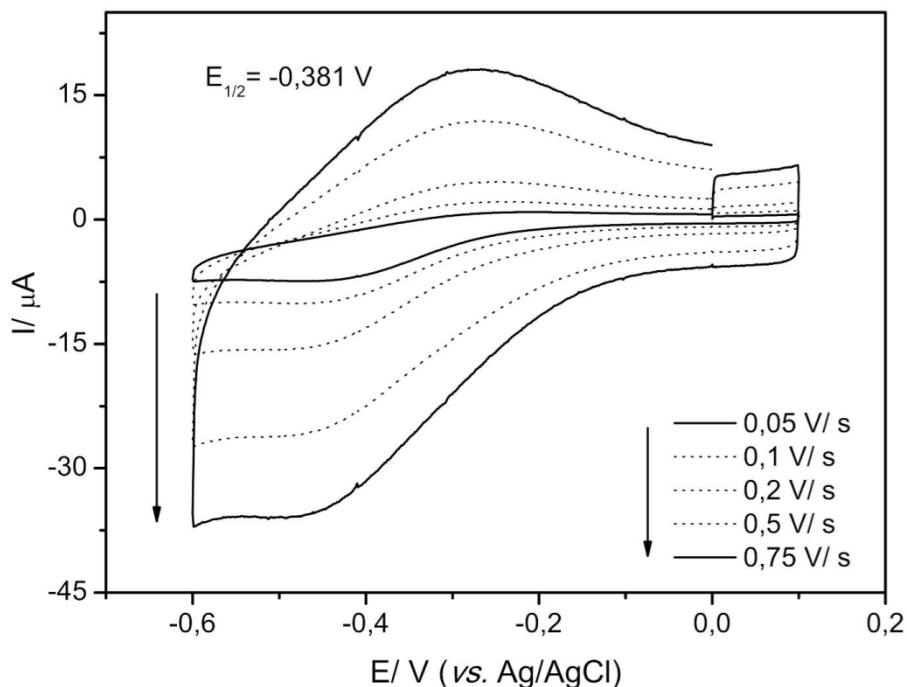


Fig. 3.41 - Voltametria cíclica da PpcA imobilizada sobre o eléctrodo de FTO-Au com velocidades de varrimento diferentes, numa solução aquosa de KNO_3 0,1 M e tampão fosfato 10 mM pH 7.

Como se pode ver pelas figuras 3.40 e 3.41 os potenciais para redução da PpcA quando em solução e quando imobilizada sobre o eléctrodo são praticamente idênticos (380 mV) indicando que a influência da ligação da PpcA ao eléctrodo é muito pequena e que a ligação da proteína ao MPA não tem influência sobre a redução do ferro dos grupos hemo. Pode-se ver também nas figuras 3.40 e 3.41 que o sinal de redução do grupo hemo é mais evidenciado do que a sua oxidação, pois o sinal de oxidação não apresenta a mesma intensidade de corrente que o sinal de redução. Este comportamento é provavelmente devido à forma reduzida da PpcA ser menos estável e como tal esta pode ser facilmente oxidada provavelmente por entrar em contacto com o oxigénio que possa ter entrado no sistema.

3.5.3 Estudo da detecção e redução de CrO_4^{2-} com o bionanoeléctrodo de FTO-Au-PpcA

Como já referido anteriormente na “Introdução Teórica” o cromato é um composto extremamente perigoso devido aos seus efeitos tóxicos, genotóxicos e cancerígeno^{23,24}, tornando assim a sua detecção e redução para Cr(III), que nesta forma não consegue penetrar dentro das células²⁴, por parte deste sistema de bionanoeléctrodo muito importante em termos de aplicação da bionanotecnologia em biorremediação. Com o intuito de verificar a catálise de redução de cromato por parte da PpcA quando imobilizada no eléctrodo de FTO-Au (Figura 3.42).

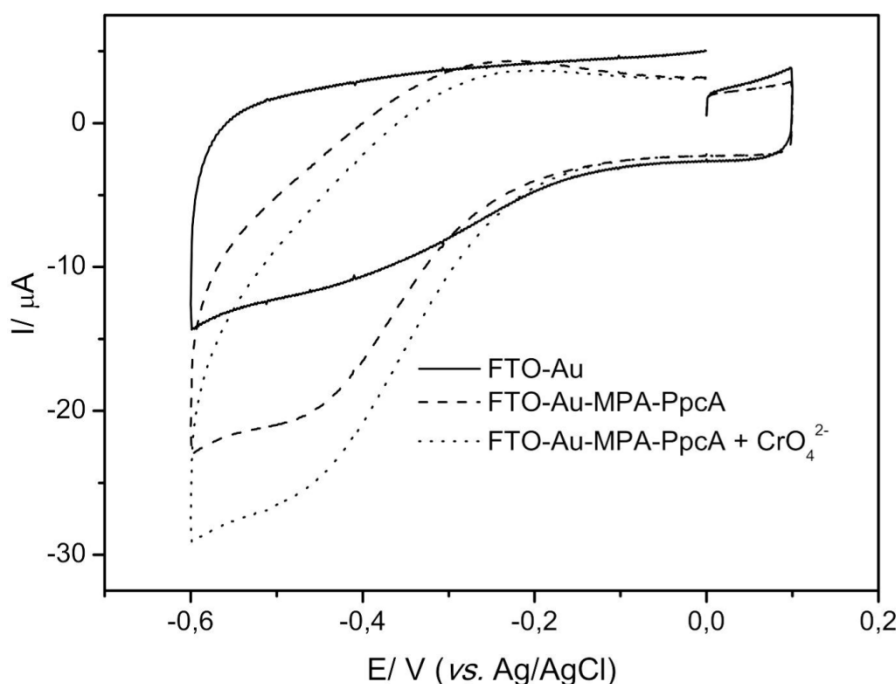


Fig. 3.42 - Voltametria cíclica em tampão fosfato 10 mM pH 7 e KNO_3 0,1 M utilizando o eléctrodo FTO-Au (linha contínua), o eléctrodo FTO-Au-PpcA (linha tracejada) e o mesmo

eléctrodo numa solução onde foi adicionado CrO_4^{2-} 25 mM (linha picotada), com uma velocidade de varrimento de 0,2 V/s.

Observando a figura 3.42 verifica-se que a adição de cromato levou a um aumento no sinal de redução da PpcA. Este aumento de sinal é indicativo da electrocatálise realizada pela PpcA na redução de cromato, demonstrando a capacidade desta proteína para realizar a redução de Cr(VI) a Cr(III), capacidade que já tinha sido observada em proteínas semelhantes, nomeadamente em citocromos c_7 ¹¹².

Capítulo IV: Conclusões

4 Conclusões

Antes de se iniciarem os estudos com os bionanoconjugados foi necessário avaliar a estabilidade das AuNP em condições de força iónica e pH.

Tal como já foi referido nesta dissertação as AuNP são sensíveis ao aumento de força iónica e tal ficou comprovado pois estas perderam a sua estabilidade, em solução, agregando a concentrações de NaCl superiores a 30 mM.

Relativamente ao pH, verificou-se que as AuNP perderam a estabilidade, garantida pela carga superficial negativa conferida pela camada de MUA, quando foi atingido o valor de pKa deste agente de revestimento, induzindo a agregação das nanopartículas.

O procedimento experimental para a formação dos bionanoconjugados é relativamente simples no entanto foi necessário garantir que a interacção entre a PpcA e a AuNP-MUA, a conjugação, efectivamente ocorreria.

Através de medições de potencial zeta conseguiu-se verificar que de facto ocorreu conjugação da PpcA com a superfície das AuNP, o potencial zeta tornou-se cada vez menos negativo à medida que a concentração de PpcA aumentava. Com esta técnica verificou-se ainda que a quantidade de PpcA necessária para revestir totalmente a AuNP de modo a não variar o potencial zeta, por mais quantidade de PpcA adicionada, situa-se numa proporção entre 100 e 200 moléculas de PpcA para uma AuNP.

Outra técnica utilizada para comprovar a conjugação foi a espectroscopia de UV/Visível. Através do espectro de UV/Visível dos bionanoconjugados, nomeadamente das alterações observáveis nas bandas características dos dois componentes, banda de Soret da PpcA e a banda da plasmónica das AuNP. No espectro UV/Visível dos bionanoconjugados foi possível determinar duas provas da conjugação entre a PpcA e a AuNP. A banda de Soret diminui a sua intensidade quando a PpcA está conjugada à superfície da AuNP, provavelmente devido à sua imobilização na superfície da nanopartícula impedindo que absorva radiação da mesma forma como em solução. A banda da plasmónica sofre um ligeiro desvio de seis nanómetros para comprimentos de onda superiores devido à interacção da PpcA com a superfície das AuNP, alterando assim o ambiente químico à superfície das nanopartículas. Estas duas alterações no espectro de UV/Visível dos bionanoconjugados comprovam que existe efectivamente conjugação. Recorrendo a um software de simulação de espectros, foi visto que o desvio sofrido pela banda da plasmónica é causado pelo surgimento de uma banda a 550 nm que aumenta de intensidade à medida que a concentração de PpcA aumenta.

A electroforese em gel de agarose também foi utilizada para comprovar a conjugação entre estes dois componentes. Foi efectuada uma electroforese com AuNP e bionanoconjugados com diferentes proporções de PpcA e foi observado que as AuNP e os bionanoconjugados com 10 moléculas de proteína para uma nanopartícula não apresentam migração para o pólo positivo, enquanto os bionanoconjugados com proporções mais elevadas

apresentam migração. Também foi possível verificar através da migração dos bionanoconjugados que a quantidade de PpcA necessária para revestir totalmente a nanopartícula estaria entre 100 e 200 moléculas de proteína para uma nanopartículas, o que está de acordo com o obtido por potencial zeta. Foi possível determinar este resultado pois a estas proporções ocorre uma saturação da migração e os bionanoconjugados com proporção superior migram todos a mesma distância.

Recorreu-se também a espectroscopia de RMN de modo a comprovar a conjugação da PpcA com as AuNP através de espectros 1D-[^1H] e 2D-[^1H - ^{15}N]-HSQC obtidos na ausência e na presença dos bionanoconjugados. Verificou-se que existe não só conjugação entre as AuNP e a PpcA, mas também que a interacção é específica. Nos espectros de RMN unidimensionais observou-se que apenas alguns sinais de substituintes do hemo IV são afectados. Do mesmo modo, nos espectros bidimensionais apenas alguns sinais ^1H - ^{15}N da cadeia polipeptídica são afectados. Por análise dos desvios químicos destes últimos sinais conseguiu-se mapear a zona da proteína de interacção entre a PpcA e as AuNP, a qual corresponde a uma zona definida situada nas imediações do hemo IV.

A estabilidade dos bionanoconjugados foi estudada de forma análoga à efectuada para as AuNP.

A estabilidade ao aumento da força iónica foi estudada utilizando bionanconjugados com diferentes proporções de PpcA e AuNP de modo a determinar a proporção a que não foi possível induzir a agregação dos bionanoconjugados com o aumento da concentração de NaCl até 1 M. O resultado obtido neste estudo foi concordante com o obtido com as técnicas mencionadas anteriormente, pois a proporção em que os bionanoconjugados são estáveis a força iónica de 1 M, é de 200 moléculas de PpcA para uma nanopartícula.

Relativamente ao pH verificou-se que contrariamente às AuNP sozinhas os bionanoconjugados apresentam agregação a valores de pH inferiores a 7. Verificou-se também que a valores de pH muito ácidos, 2 e 3, os bionanoconjugados não apresentam agregação se o pH for alterado de forma brusca, indicando que possivelmente existe uma quebra na interacção da proteína com as AuNP e que a PpcA que fica em solução forma uma malha polimérica que protege as nanopartículas de agregarem.

Verificou-se também que a estabilidade dos bionanoconjugados, relativamente à agregação com o aumento da concentração de NaCl, depende do tempo a que os dois componentes são deixados a conjugar antes de se iniciarem os estudos. Determinou-se que a agregação com o aumento da concentração de NaCl diminui em bionanconjugados com 15 dias de conjugação, comparativamente a bionanoconjugados com 1 dia de conjugação em que rapidamente agregaram, utilizando as mesmas concentrações de NaCl.

A actividade da PpcA na redução de Cr(VI) para Cr(III) foi determinada através de voltametria cíclica imobilizada num eléctrodo de FTO modificado à superfície com ouro nanoestruturado.

Verificou-se que a modificação do eléctrodo de FTO com ouro nanoestruturado aumentou em grande escala a eficiência do eléctrodo pois a separação dos picos catódico e anódico diminuiu em cerca de 119 mV.

A imobilização da PpcA ao eléctrodo de FTO modificado com ouro nanoestruturado foi efectuada a partir da estratégia de reticulação com EDC/NHS. Esta imobilização foi bem sucedida pois o sinal electroquímico da PpcA quando em solução ou imobilizada na superfície do eléctrodo foi idêntico, provando assim que não só a PpcA está presente na superfície do eléctrodo como também que a sua imobilização não altera as suas propriedades de transferência electrónica.

Verificou-se também que a PpcA é capaz de reduzir o Cr(VI) a Cr(III) pois na presença de cromato o sinal electroquímico da PpcA sofreu um aumento de intensidade no pico da redução, provando assim a electrocatálise da reacção de redução de cromato.

Assim, conclui-se que o trabalho desenvolvido nesta dissertação consiste num estudo adequado para a preparação de bionanoconjugados, de PpcA e AuNP-MUA, estáveis e activos na biorremediação de Cr(VI) por redução dissimilatória.

Capítulo V: Bibliografía

5 Bibliografia

- (1) Crawford, D. L.; Crawford, R. L.: *Bioremediation: Principles and Applications*; Cambridge University Press, 1996.
- (2) Lovley, D. R.; Lloyd, J. R.: Microbes with a mettle for bioremediation. *Nat Biotechnol* **2000**, 18, 600-1.
- (3) Alvarez, P. J. J.; Illman, W. A.: *Bioremediation and Natural Attenuation*; Wiley-Interscience, 2006.
- (4) Lovley, D. R.: Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nat Rev Microbiol* **2003**, 1, 35-44.
- (5) Trombly, J.: Engineering Enzymes for Better Bioremediation. *Environ Sci Technol* **1995**, 29, 560-564.
- (6) Brim, H.; McFarlan, S. C.; Fredrickson, J. K.; Minton, K. W.; Zhai, M.; Wackett, L. P.; Daly, M. J.: Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nat Biotechnol* **2000**, 18, 85-90.
- (7) Lovley, D. R.: Dissimilatory Metal Reduction: from early life to bioremediation. *ASM News* **2002**, 68, 231-237.
- (8) Lovley, D. R.: Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction. *J Ind Microbiol* **1995**, 14, 85-93.
- (9) Bailey, R. A.; Clark, H. M.; Ferris, J. P.; Krause, J.; Strong, R. L.: *Chemistry of the Environment*; Harcourt/Academic Press, 2002.
- (10) Cotterel, M.: *The Terracota Warriors: The Secret Codes of the Emperor's Army*; Rochester: Bear and Company, 2004.
- (11) Guertin, J.; Jacobs, J. A.; Avakian, C. P.: *Chromium(VI) Handbook*; CRC Press, 2005.
- (12) Dennis, J. K.; Such, T. E.: History of Chromium Plating. In *Nickel and Chromium Plating*; Woodhead Publishing, 1993; pp 9-12.
- (13) Steel Glossary. American Iron and Steel Institute, 2004.
- (14) Edwards, J.: *Coating and Surface Treatment Systems for Metals*; Finishing Publications Ltd. and ASMy International, 1997.
- (15) Gettens, J. R.: Chrome Yellow. In *Painting Materials: A Short Encyclopaedia*; Courier Dover Publications, 1966; pp 105-106.
- (16) Carstens, H.: The Red-Green Change in Chromium-Bearing Garnets. *Contributions to Mineralogy and Petrology* **1973**, 41, 273-276.
- (17) Moss, S. C.; Newham, R. E.: The chromium position in ruby. *Z Kristallogr* **1964**, 120, 359-363.
- (18) Brown, E. M.: A Conformational Study of Collagen as Affected by Tanning Procedures. *Journal of the American Leather Chemists Association* **1997**, 92, 225-233.
- (19) Hingston, J. A.; Collins, C. D.; Murphy, R. J.; Lester, J. N.: Leaching of chromated copper arsenate wood preservatives: a review. *Environmental Pollution* **2001**, 111, 53-66.
- (20) Di Bona, K. R.; Love, S.; Rhodes, N. R.; McAdory, D.; Sinha, S. H.; Kern, N.; Kent, J.; Strickland, J.; Wilson, A.; Beaird, J.; Ramage, J.; Rasco, J. F.; Vincent, J. B.: Chromium is not an essential trace element for mammals: effects of a "low-chromium" diet. *J Biol Inorg Chem* **2011**, 16, 381-90.
- (21) Mertz, W.: Chromium in human nutrition: a review. *J Nutr* **1993**, 123, 626-33.
- (22) Eastmond, D. A.; Macgregor, J. T.; Slesinski, R. S.: Trivalent chromium: assessing the genotoxic risk of an essential trace element and widely used human and animal nutritional supplement. *Crit Rev Toxicol* **2008**, 38, 173-90.
- (23) Barceloux, D. G.: Chromium. *J Toxicol Clin Toxicol* **1999**, 37, 173-94.
- (24) Salnikow, K.; Zhitkovich, A.: Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem Res Toxicol* **2008**, 21, 28-44.
- (25) Stearns, D. M.; Courtney, K. D.; Giangrande, P. H.; Phieffer, L. S.; Wetterhahn, K. E.: Chromium(VI) reduction by ascorbate: role of reactive intermediates in DNA damage in vitro. *Environ Health Perspect* **1994**, 102 Suppl 3, 21-5.

- (26) Stearns, D. M.; Kennedy, L. J.; Courtney, K. D.; Giangrande, P. H.; Phieffer, L. S.; Wetterhahn, K. E.: Reduction of chromium(VI) by ascorbate leads to chromium-DNA binding and DNA strand breaks in vitro. *Biochemistry-Us* **1995**, *34*, 910-9.
- (27) Cohen, M. D.; Kargacin, B.; Klein, C. B.; Costa, M.: Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity. *Crit Rev Toxicol* **1993**, *23*, 255-81.
- (28) Roundhill, M.: Novel Strategies for the Removal of Toxic Metals from Soil and Waters. *J Chem Educ* **2004**, *81*, 275-282.
- (29) Al Hasin, A.; Gurman, S. J.; Murphy, L. M.; Perry, A.; Smith, T. J.; Gardiner, P. H.: Remediation of chromium(VI) by a methane-oxidizing bacterium. *Environ Sci Technol* **2010**, *44*, 400-5.
- (30) Opperman, D. J.; van Heerden, E.: Aerobic Cr(VI) reduction by *Thermus scotoductus* strain SA-01. *J Appl Microbiol* **2007**, *103*, 1907-13.
- (31) Michel, C.; Brugna, M.; Aubert, C.; Bernadac, A.; Bruschi, M.: Enzymatic reduction of chromate: comparative studies using sulfate-reducing bacteria. Key role of polyheme cytochromes *c* and hydrogenases. *Appl Microbiol Biot* **2001**, *55*, 95-100.
- (32) Lovley, D. R.: Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2006**, *4*, 497-508.
- (33) Mahadevan, R.; Bond, D. R.; Butler, J. E.; Esteve-Nunez, A.; Coppi, M. V.; Palsson, B. O.; Schilling, C. H.; Lovley, D. R.: Characterization of metabolism in the Fe(III)-reducing organism *Geobacter sulfurreducens* by constraint-based modeling. *Appl Environ Microb* **2006**, *72*, 1558-68.
- (34) Ding, Y. H.; Hixson, K. K.; Giometti, C. S.; Stanley, A.; Esteve-Nunez, A.; Khare, T.; Tollaksen, S. L.; Zhu, W.; Adkins, J. N.; Lipton, M. S.; Smith, R. D.; Mester, T.; Lovley, D. R.: The proteome of dissimilatory metal-reducing microorganism *Geobacter sulfurreducens* under various growth conditions. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1764*, 1198-206.
- (35) Morgado, L.; Bruix, M.; Pessanha, M.; Londer, Y. Y.; Salgueiro, C. A.: Thermodynamic characterization of a triheme cytochrome family from *Geobacter sulfurreducens* reveals mechanistic and functional diversity. *Biophys J* **2010**, *99*, 293-301.
- (36) Lloyd, J. R.; Leang, C.; Myerson, A. L. H.; Coppi, M. V.; Cuifo, S.; Methe, B.; Sandler, S. J.; Lovley, D. R.: Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic *c*-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem J* **2003**, *369*, 153-161.
- (37) Pokkuluri, P. R.; Londer, Y. Y.; Duke, N. E.; Long, W. C.; Schiffer, M.: Family of cytochrome *c*₇-type proteins from *Geobacter sulfurreducens*: structure of one cytochrome *c*₇ at 1.45 Å resolution. *Biochemistry-Us* **2004**, *43*, 849-59.
- (38) Londer, Y. Y.; Pokkuluri, P. R.; Tiede, D. M.; Schiffer, M.: Production and preliminary characterization of a recombinant triheme cytochrome *c*₇ from *Geobacter sulfurreducens* in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **2002**, *1554*, 202-11.
- (39) Fernandes, A. P.; Couto, I.; Morgado, L.; Londer, Y. Y.; Salgueiro, C. A.: Isotopic labeling of *c*-type multiheme cytochromes overexpressed in *E. coli*. *Protein Express Purif* **2008**, *59*, 182-188.
- (40) Pessanha, M.; Londer, Y. Y.; Long, W. C.; Erickson, J.; Pokkuluri, P. R.; Schiffer, M.; Salgueiro, C. A.: Redox characterization of *Geobacter sulfurreducens* cytochrome *c*₇: physiological relevance of the conserved residue F15 probed by site-specific mutagenesis. *Biochemistry-Us* **2004**, *43*, 9909-17.
- (41) Seeliger, S.; Cord-Ruwisch, R.; Schink, B.: A periplasmic and extracellular *c*-type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* acts as a ferric iron reductase and as an electron carrier to other acceptors or to partner bacteria. *J Bacteriol* **1998**, *180*, 3686-3691.
- (42) Renshaw, J. C.; Butchins, L. J.; Livens, F. R.; May, I.; Charnock, J. M.; Lloyd, J. R.: Bioreduction of uranium: environmental implications of a pentavalent intermediate. *Environ Sci Technol* **2005**, *39*, 5657-60.
- (43) Skoog, D. A.; Holler, J. F.; Nieman, T. A.: *Principles of Instrumental Analysis*; 6th ed.; Harcourt College Publishers, 2006.
- (44) Magnuson, T. S.; Isoyama, N.; Hodges-Myerson, A. L.; Davidson, G.; Maroney, M. J.; Geesey, G. G.; Lovley, D. R.: Isolation, characterization and gene sequence analysis of a membrane-associated 89 kDa Fe(III) reducing cytochrome *c* from *Geobacter sulfurreducens*. *The Biochemical journal* **2001**, *359*, 147-52.

- (45) Boffi, A.; Das, T. K.; della Longa, S.; Spagnuolo, C.; Rousseau, D. L.: Pentacoordinate hemin derivatives in sodium dodecyl sulfate micelles: model systems for the assignment of the fifth ligand in ferric heme proteins. *Biophys J* **1999**, *77*, 1143-9.
- (46) Stryer, L.; Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.: *Biochemistry*; W. H. Freeman and Company, 2007.
- (47) Teng, Q.: *Structural Biology - Practical NMR Applications*; Springer Science: Berlin, 2005.
- (48) Rance, M.; Cavanagh, J.; Fairbrother, W. J.; Hunt III, A. W.; Skelton, N. J.: *Protein NMR spectroscopy: principles and practice*; Academic Press: Boston, 2007.
- (49) Wuthrich, K.: NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, *42*, 3340-63.
- (50) Gazit, E.: *Plenty of Room for Biology at the Bottom*; Imperial College Press, 2007.
- (51) Buzea, C.; Pacheco, II; Robbie, K.: Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* **2007**, *2*, MR17-71.
- (52) Roduner, E.: Size matters: why nanomaterials are different. *Chem Soc Rev* **2006**, *35*, 583-92.
- (53) El-Sayed, M. A.: Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Accounts Chem Res* **2001**, *34*, 257-64.
- (54) Liz-Marzan, L. M.: Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2006**, *22*, 32-41.
- (55) Daniel, M. C.; Astruc, D.: Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev* **2004**, *104*, 293-346.
- (56) Lee, K. S.; El-Sayed, M. A.: Dependence of the enhanced optical scattering efficiency relative to that of absorption for gold metal nanorods on aspect ratio, size, end-cap shape, and medium refractive index. *J Phys Chem B* **2005**, *109*, 20331-8.
- (57) Lee, K. S.; El-Sayed, M. A.: Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition. *J Phys Chem B* **2006**, *110*, 19220-5.
- (58) Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A.: Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *J Phys Chem B* **2006**, *110*, 7238-48.
- (59) Templeton, A. C.; Pietron, J. J.; Murray, R. W.; Mulvaney, P.: Solvent Refractive Index and Core Charge Influences on the Surface Plasmon Absorbance of Alkanethiolate Monolayer-Protected Gold Clusters. *J Phys Chem B* **2000**, *104*, 564-570.
- (60) Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A.: Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem B* **2006**, *110*, 15700-15707.
- (61) Martin, M. N.; Basham, J. I.; Chando, P.; Eah, S. K.: Charged gold nanoparticles in non-polar solvents: 10-min synthesis and 2D self-assembly. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2010**, *26*, 7410-7.
- (62) Perrault, S. D.; Chan, W. C.: Synthesis and surface modification of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles of 50-200 nm. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 17042-3.
- (63) Brust, M.; Walter, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R.: Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System *J Chem Soc Chem Comm* **1994**, 801-802.
- (64) Streicher, H. Z.; Gabow, P. A.; Moss, A. H.; Kono, D.; Kaehny, W. D.: Syndromes of toluene sniffing in adults. *Ann Intern Med* **1981**, *94*, 758-62.
- (65) Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G.: Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal Chem* **2007**, *79*, 4215-4221.
- (66) Willner, I.; Baron, R.; Willner, B.: Biomolecule-nanoparticle hybrids as functional units for nanobiotechnology. *Chem Commun (Camb)* **2007**, 323-332.
- (67) You, C. C.; Verma, A.; Rotello, V. M.: Engineering the nanoparticle-biomacromolecule interface. *Soft Matter* **2006**, *2*, 190-204.
- (68) Zheng, M.; Huang, X. Y.: Nanoparticles comprising a mixed monolayer for specific bindings with biomolecules. *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 12047-12054.

- (69) Franco, R.; Baptista, P.; Pereira, E.; Eaton, P.; Doria, G.; Miranda, A.; Gomes, I.; Quaresma, P.: Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal Bioanal Chem* **2008**, 391, 943-950.
- (70) Georganopoulou, D. G.; Chang, L.; Nam, J. M.; Thaxton, C. S.; Mufson, E. J.; Klein, W. L.; Mirkin, C. A.: Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *P Natl Acad Sci USA* **2005**, 102, 2273-6.
- (71) Baptista, P.; Doria, G.; Henriques, D.; Pereira, E.; Franco, R.: Colorimetric detection of eukaryotic gene expression with DNA-derivatized gold nanoparticles. *J Biotechnol* **2005**, 119, 111-7.
- (72) Thanh, N. T.; Rosenzweig, Z.: Development of an aggregation-based immunoassay for anti-protein A using gold nanoparticles. *Anal Chem* **2002**, 74, 1624-8.
- (73) Zhang, C.; Zhang, Z.; Yu, B.; Shi, J.; Zhang, X.: Application of the biological conjugate between antibody and colloid Au nanoparticles as analyte to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem* **2002**, 74, 96-9.
- (74) Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C. K.; Rotello, V. M.: Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev* **2008**, 60, 1307-15.
- (75) Ghosh, P.; Yang, X.; Arvizo, R.; Zhu, Z. J.; Agasti, S. S.; Mo, Z.; Rotello, V. M.: Intracellular delivery of a membrane-impermeable enzyme in active form using functionalized gold nanoparticles. *J Am Chem Soc* **2010**, 132, 2642-5.
- (76) Mali, P.; Bhattacharjee, N.; Searson, P. C.: Electrochemically programmed release of biomolecules and nanoparticles. *Nano Lett* **2006**, 6, 1250-3.
- (77) Lynch, I.; Dawson, K. A.: Protein-Nanoparticle Interactions. *NanoToday* **2008**, 3, 40-47.
- (78) Srivastava, S.; Verma, A.; Frankamp, B. L.; Rotello, V. M.: Controlled Assembly of Protein-Nanoparticle Composites through Protein Surface Recognition. *Advanced Materials* **2005**, 17, 617-621.
- (79) Burt, J. L.; Gutierrez-Wing, C.; Miki-Yoshida, M.; Jose-Yacaman, M.: Noble-metal nanoparticles directly conjugated to globular proteins. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2004**, 20, 11778-83.
- (80) Brewer, S. H.; Glomm, W. R.; Johnson, M. C.; Knag, M. K.; Franzen, S.: Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2005**, 21, 9303-7.
- (81) Aubin-Tam, M. E.; Hamad-Schifferli, K.: Gold nanoparticle-cytochrome C complexes: the effect of nanoparticle ligand charge on protein structure. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2005**, 21, 12080-4.
- (82) Gomes, I.; Santos, N. C.; Oliveira, L. M. A.; Quintas, A.; Eaton, P.; Pereira, E.; Franco, R.: Probing Surface Properties of Cytochrome c at Au Bionanoconjugates. *J Phys Chem C* **2008**, 112, 16340-16347.
- (83) Jiang, X.; Jiang, J.; Jin, Y.; Wang, E.; Dong, S.: Effect of colloidal gold size on the conformational changes of adsorbed cytochrome c: probing by circular dichroism, UV-visible, and infrared spectroscopy. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 46-53.
- (84) Levy, R.: Peptide-capped gold nanoparticles: Towards artificial proteins. *ChemBiochem* **2006**, 7, 1141-1145.
- (85) Kaufman, E. D.; Belyea, J.; Johnson, M. C.; Nicholson, Z. M.; Ricks, J. L.; Shah, P. K.; Bayless, M.; Pettersson, T.; Feldoto, Z.; Blomberg, E.; Claesson, P.; Franzen, S.: Probing protein adsorption onto mercaptoundecanoic acid stabilized gold nanoparticles and surfaces by quartz crystal microbalance and zeta-potential measurements. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2007**, 23, 6053-62.
- (86) Lunt, E. A.; Pitter, M. C.; O'Shea, P.: Quantitative studies of the interactions of metalloproteins with gold nanoparticles: identification of dominant properties of the protein that underlies the spectral changes. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2009**, 25, 10100-6.
- (87) Bayraktar, H.; You, C. C.; Rotello, V. M.; Knapp, M. J.: Facial control of nanoparticle binding to cytochrome c. *J Am Chem Soc* **2007**, 129, 2732-3.
- (88) Jiang, X.; Shang, L.; Wang, Y.; Dong, S.: Cytochrome c superstructure biocomposite nucleated by gold nanoparticle: thermal stability and voltammetric behavior. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 3030-6.

- (89) Cortez, J.; Vorobieva, E.; Gralheira, D.; Osorio, I.; Soares, L.; Vale, N.; Pereira, E.; Gomes, P.; Franco, R.: Bionanoconjugates of tyrosinase and peptide-derivatised gold nanoparticles for biosensing of phenolic compounds. *J Nanopart Res* **2011**, *13*, 1101-1113.
- (90) Kim, G. Y.; Shim, J.; Kang, M. S.; Moon, S. H.: Optimized coverage of gold nanoparticles at tyrosinase electrode for measurement of a pesticide in various water samples. *J Hazard Mater* **2008**, *156*, 141-7.
- (91) Kim, G. Y.; Shim, J.; Kang, M. S.; Moon, S. H.: Preparation of a highly sensitive enzyme electrode using gold nanoparticles for measurement of pesticides at the ppt level. *J Environ Monit* **2008**, *10*, 632-7.
- (92) Guo, S.; Wang, E.: Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Anal Chim Acta* **2007**, *598*, 181-92.
- (93) Pingarron, J. M.; Yanez-Sedeno, P.; Gonzalez-Cortes, A.: Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochim Acta* **2008**, *53*, 5848-5866.
- (94) Jensen, P. S.; Chi, Q.; Grummen, F. B.; Abad, J. M.; Horsewell, A.; Schiffrin, D. J.; Ulstrup, J.: Gold Nanoparticle Assisted Assembly of a Heme Protein for Enhancement of Long-Range Interfacial Electron Transfer. *J Phys Chem C* **2007**, *111*, 6124-6132.
- (95) Hanauer, M.; Pierrat, S.; Zins, I.; Lotz, A.; Sonnichsen, C.: Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size-and shape. *Nano Lett* **2007**, *7*, 2881-2885.
- (96) Calzolari, L.; Franchini, F.; Gilliland, D.; Rossi, F.: Protein--nanoparticle interaction: identification of the ubiquitin--gold nanoparticle interaction site. *Nano Lett* **2010**, *10*, 3101-5.
- (97) Zeta Potential Theory. In *Zetasizer Nano User Manual*; Malvern Instruments Ltd., 2009; Vol. MAN0317-5.0.
- (98) Chockalingam, M.; Darwish, N.; Le Saux, G.; Gooding, J. J.: Importance of the Indium Tin Oxide Substrate on the Quality of Self-Assembled Monolayers Formed from Organophosphonic Acids. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2011**.
- (99) Demirel, M. C.; Kao, P.; Malvadkar, N.; Wang, H.; Gong, X.; Poss, M.; Allara, D. L.: Bio-organism sensing via surface enhanced Raman spectroscopy on controlled metal/polymer nanostructured substrates. *Biointerphases* **2009**, *4*, 35-41.
- (100) Michel, C.; Battaglia-Brunet, F.; Minh, C. T.; Bruschi, M.; Ignatiadis, I.: Amperometric cytochrome c_3 -based biosensor for chromate determination. *Biosens Bioelectron* **2003**, *19*, 345-52.
- (101) Pauliukaite, R.; Ghica, M. E.; Fatibello-Filho, O.; Brett, C. M.: Comparative study of different cross-linking agents for the immobilization of functionalized carbon nanotubes within a chitosan film supported on a graphite-epoxy composite electrode. *Anal Chem* **2009**, *81*, 5364-72.
- (102) Kamat, P. V.; Huehn, R.; Nicolaescu, R.: A "Sense and Shoot" Approach for Photocatalytic Degradation of Organic Contaminants in Water. *J Phys Chem B* **2002**, *106*, 788-794.
- (103) Wishart, D. S.; Bigam, C. G.; Yao, J.; Abildgaard, F.; Dyson, H. J.; Oldfield, E.; Markley, J. L.; Sykes, B. D.: ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J Biomol NMR* **1995**, *6*, 135-40.
- (104) Smalley, J. F.; Chalfant, K.; Feldberg, S. W.; Nahir, T. M.; Bowden, E. F.: An Indirect Laser-Induced Temperature Jump Determination of the Surface pKa of 11-Mercaptoundecanoic Acid Monolayers Self-Assembled on Gold. *J Phys Chem B* **1999**, *103*, 1676-1685.
- (105) Browne, K. P.; Grzybowski, B. A.: Controlling the properties of self-assembled monolayers by substrate curvature. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2011**, *27*, 1246-50.
- (106) Zhang, D.; Neumann, O.; Wang, H.; Yuwono, V. M.; Barhoumi, A.; Perham, M.; Hartgerink, J. D.; Wittung-Stafshede, P.; Halas, N. J.: Gold nanoparticles can induce the formation of protein-based aggregates at physiological pH. *Nano Lett* **2009**, *9*, 666-71.
- (107) Morgado, L.; Fernandes, A. P.; Londer, Y. Y.; Bruix, M.; Salgueiro, C. A.: One simple step in the identification of the cofactors signals, one giant leap for the solution structure determination of multiheme proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *393*, 466-70.
- (108) Oellerich, S.; Wackerbarth, H.; Hildebrandt, P.: Spectroscopic Characterization of Nonnative Conformational States of Cytochrome c . *J Phys Chem B* **2002**, *106*, 6566-6580.

- (109) Theorell, H.; Akesson, A.: Studies on cytochrome *c*. II. The optical properties of pure cytochrome *c* and some of its derivatives. *J Am Chem Soc* **1941**, 63, 1812-1818.
- (110) Varhac, R.; Antalík, M.: Correlation of acid-induced conformational transition of ferricytochrome *c* with cyanide binding kinetics. *J Biol Inorg Chem* **2008**, 13, 713-21.
- (111) Wang, P.; Mai, Z.; Dai, Z.; Li, Y.; Zou, X.: Construction of Au nanoparticles on choline chloride modified glassy carbon electrode for sensitive detection of nitrite. *Biosens Bioelectron* **2009**, 24, 3242-7.
- (112) Sundararajan, M.; Campbell, A. J.; Hillier, I. H.: How do enzymes reduce metals? The mechanism of the reduction of Cr(VI) in chromate by cytochrome *c*₇ proteins proposed from DFT calculations. *Faraday Discuss* **2011**, 148, 195-205; discussion 207-28.

Apêndice I

6 Apêndice I

6.1.1 Composição do meio de cultura 2xYT

16 g/L de Peptona de Caseína
10g/L Extracto de Levedura
5g/L de NaCl
15g/L de Agar (para o meio sólido)

6.1.2 Composição do tampão de lise (pH 8)

100 mM Tris-HCl
0,5 mM EDTA
20% Sacarose

6.1.3 Cromatogramas

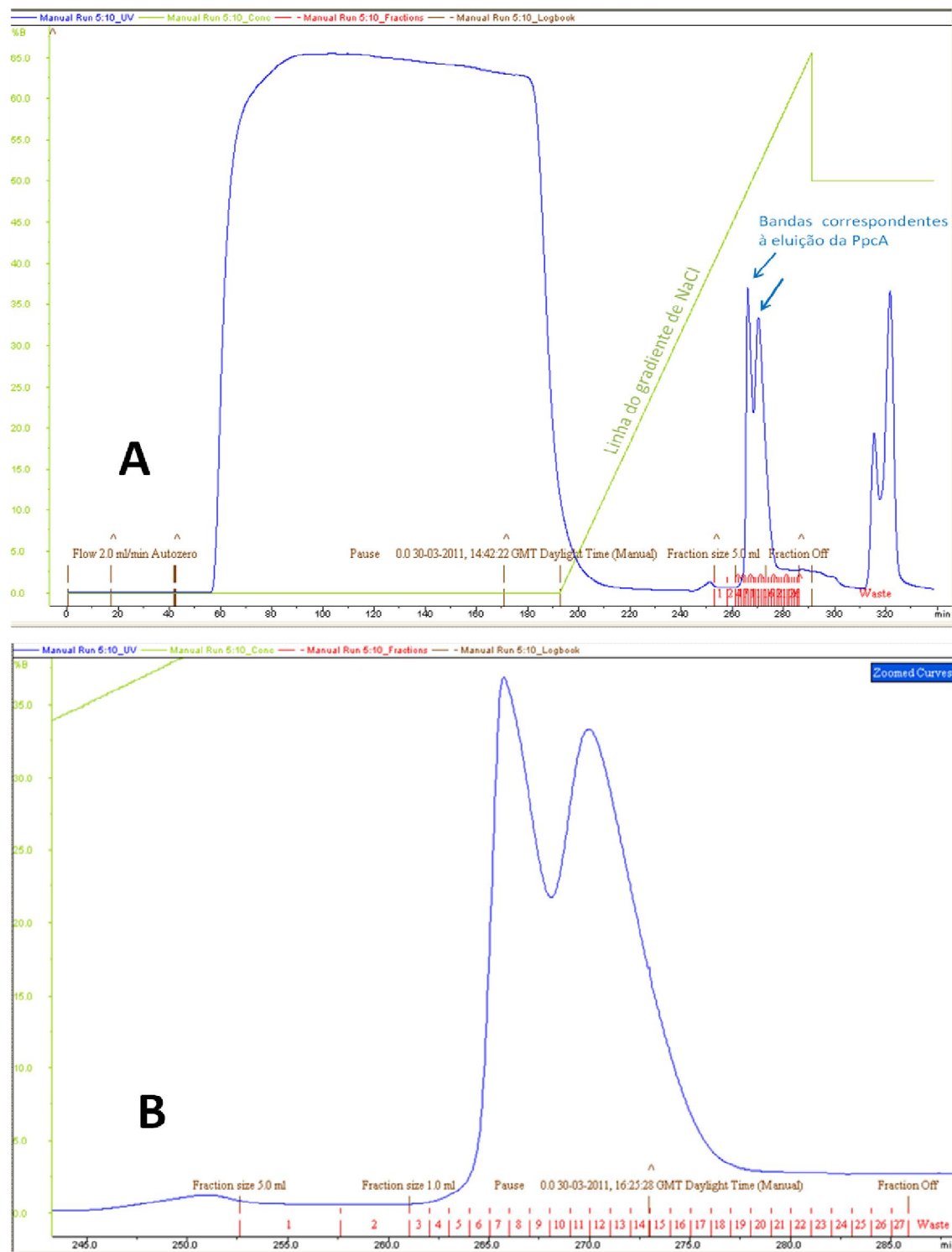


Fig. 6.1 – Cromatograma da purificação da PpcA por cromatografia de permuta iônica num sistema Äktaprime Plus (A) e com zoom na zona das bandas da eluição da PpcA (B), ver condições experimentais “Parte Experimental”.

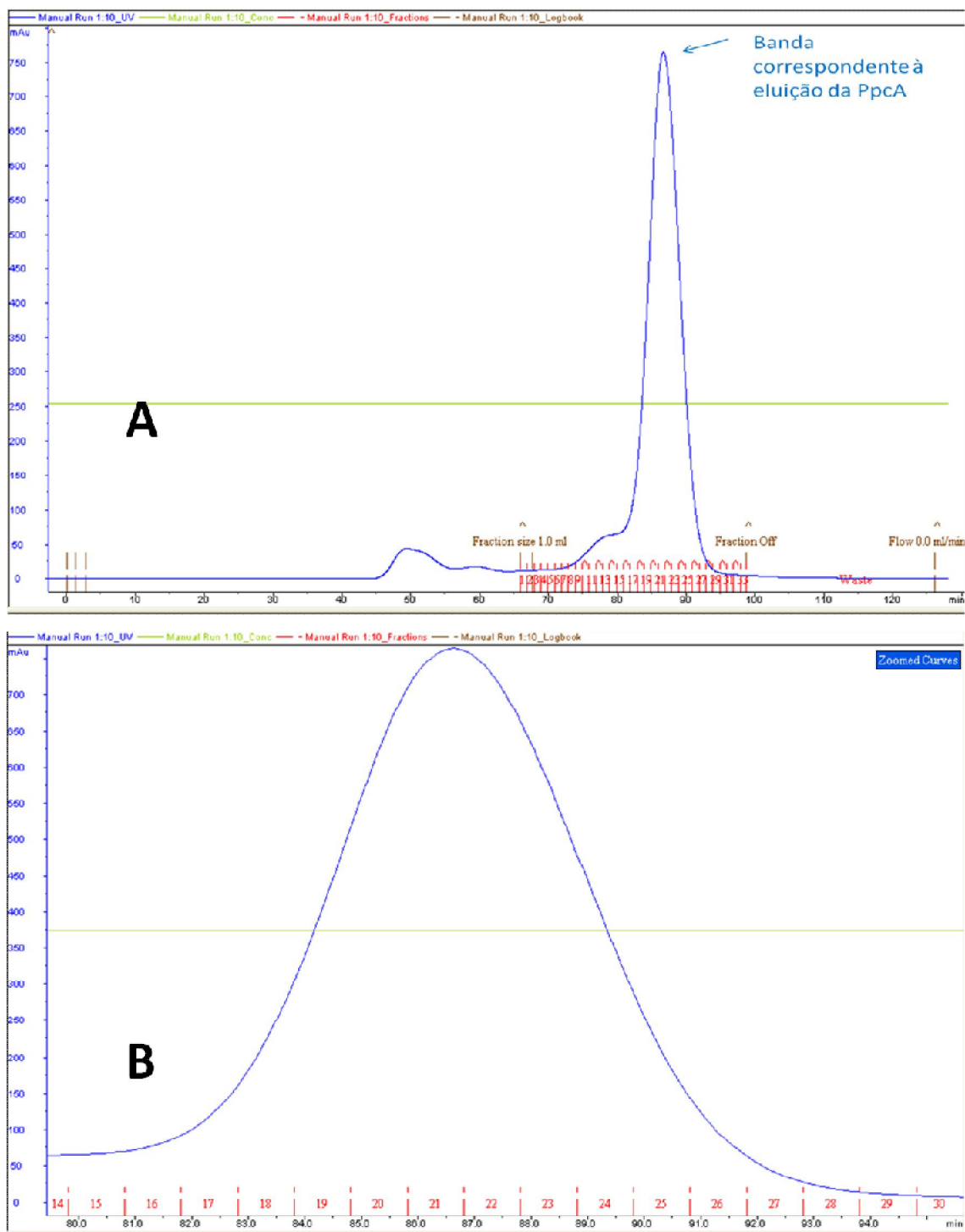


Fig. 6.2 – Cromatograma da purificação da PpcA por cromatografia de exclusão molecular num sistema Äktaprime Plus (A) e com zoom na zona da banda de eluição da PpcA (B), ver condições experimentais em “Parte Experimental”.

Apêndice II

7 Apêndice II

7.1 Estudo da formação dos bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA

7.1.1 Estudo da formação de bionanoconjugados por espectroscopia de UV/Visível

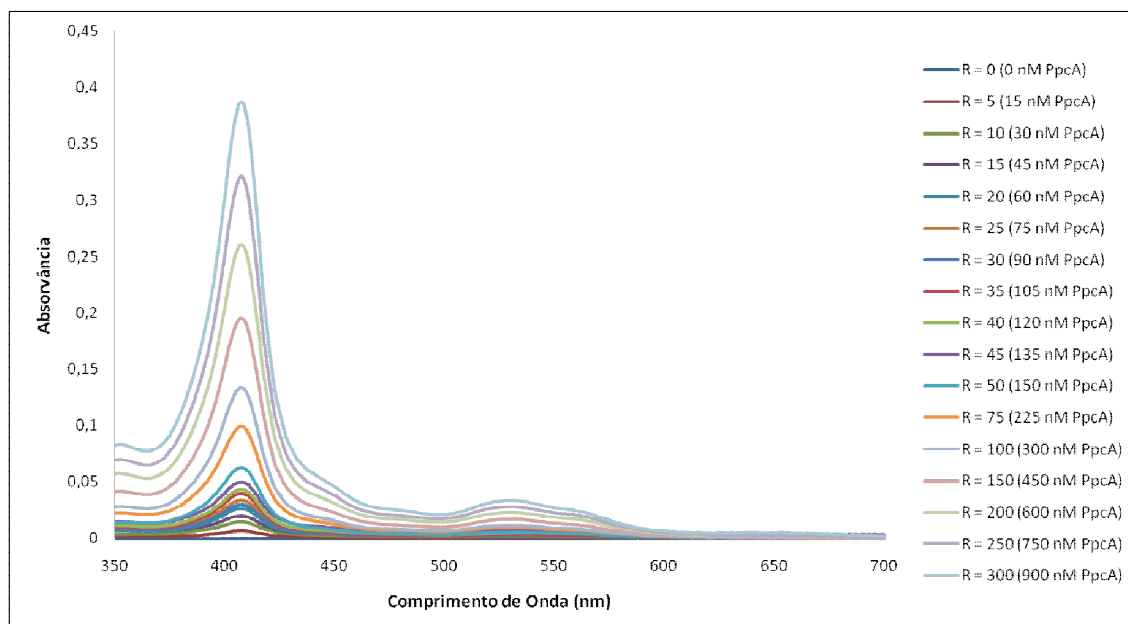


Fig. 7.1 – Espectro de UV/Visível da PpcA a diferentes concentrações.

7.1.2 Estudo da mobilidade electroforética dos bionanoconjugados em géis de agarose

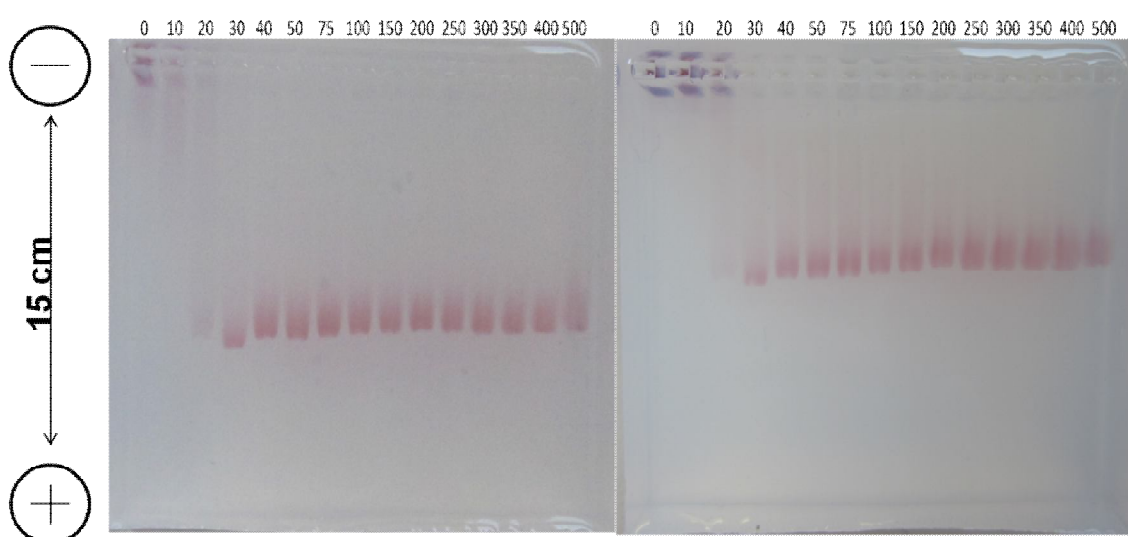
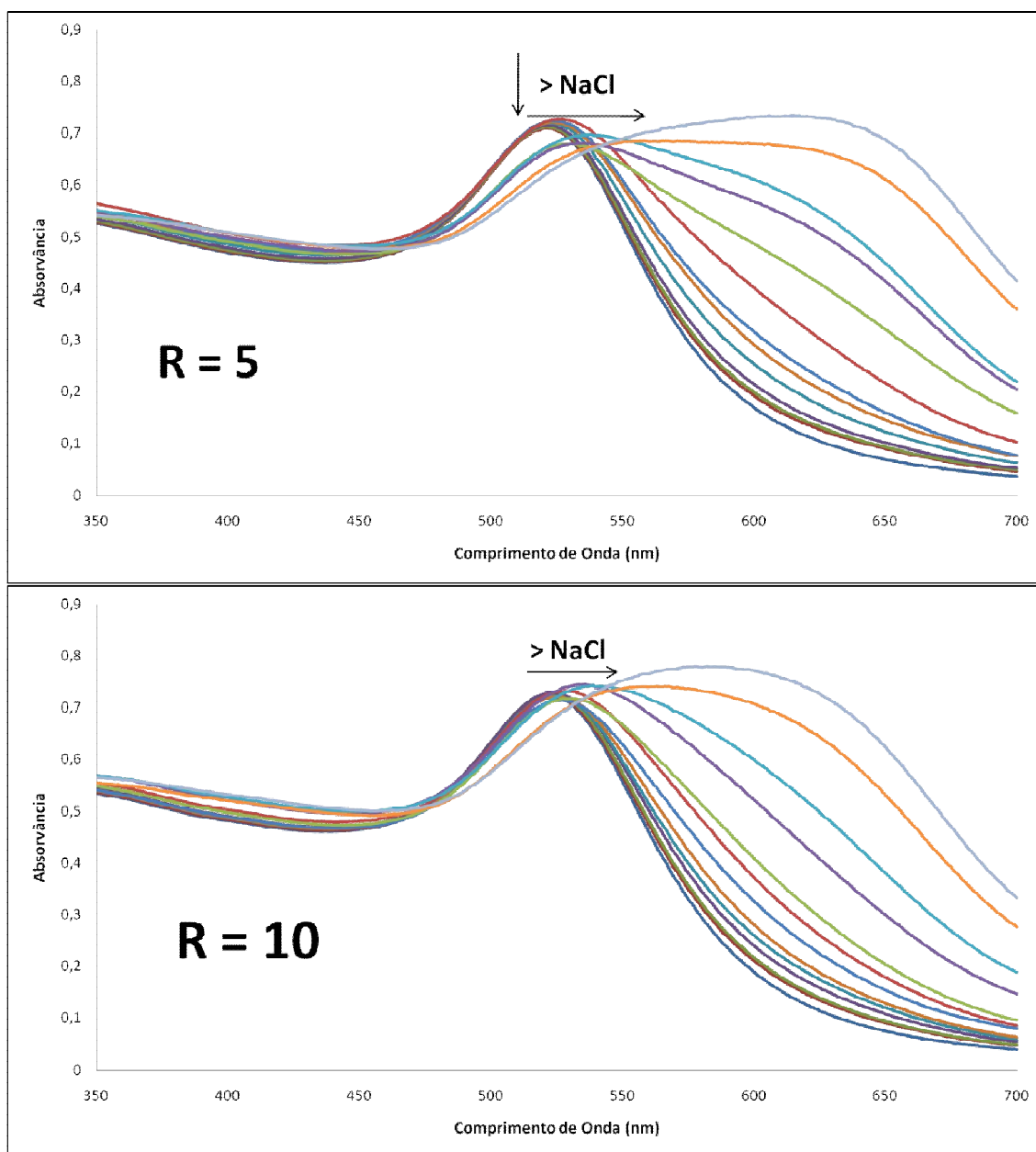


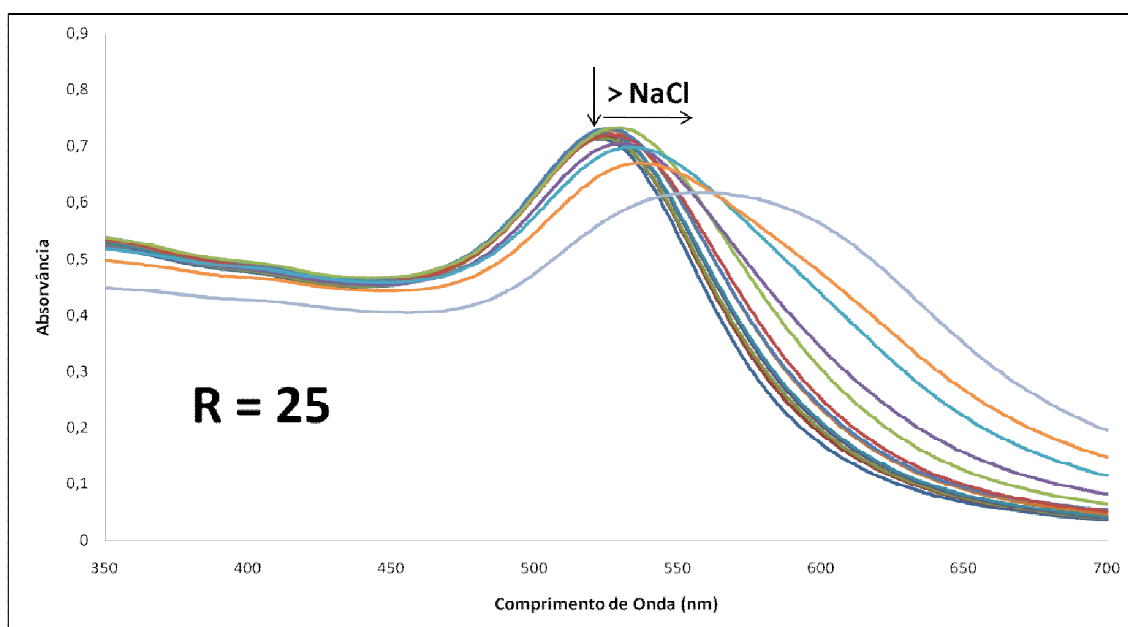
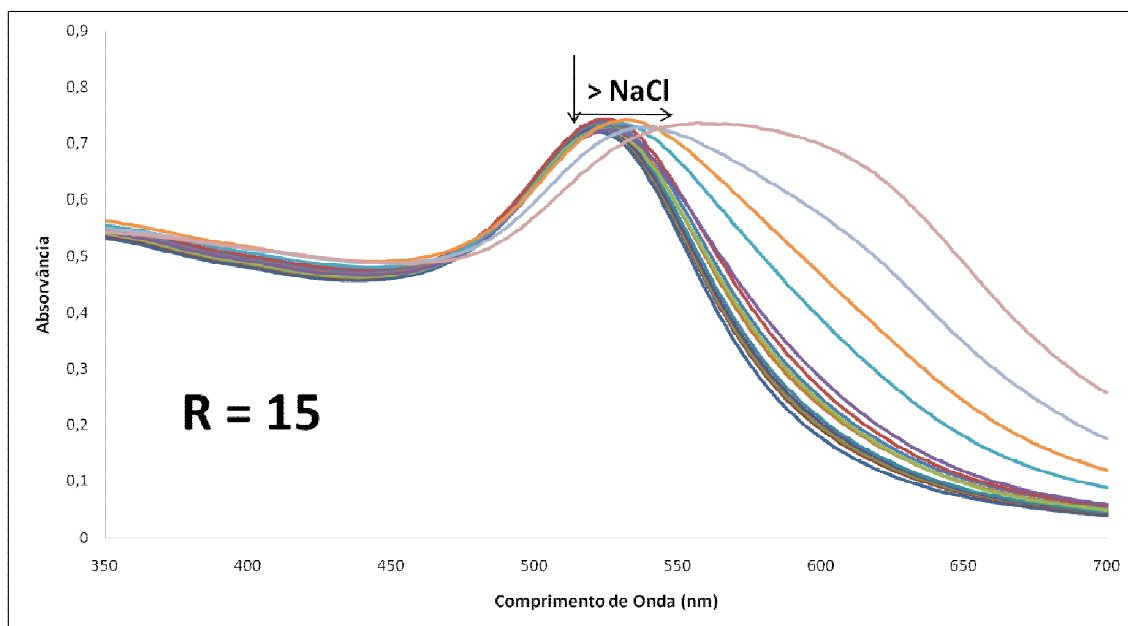
Fig. 7.2 - Esquema da separação dos eléctrodos no sistema de electroforese. Fotografias de electroforeses em géis de agarose de 1% (esquerda) e 2% (direita), de bionanoconjugados

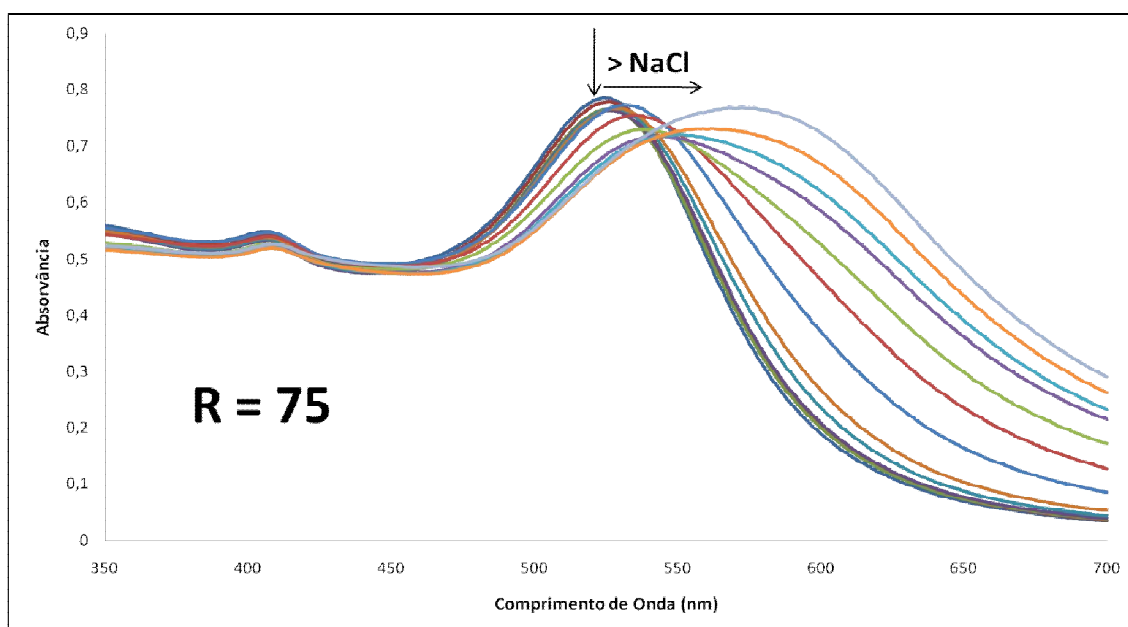
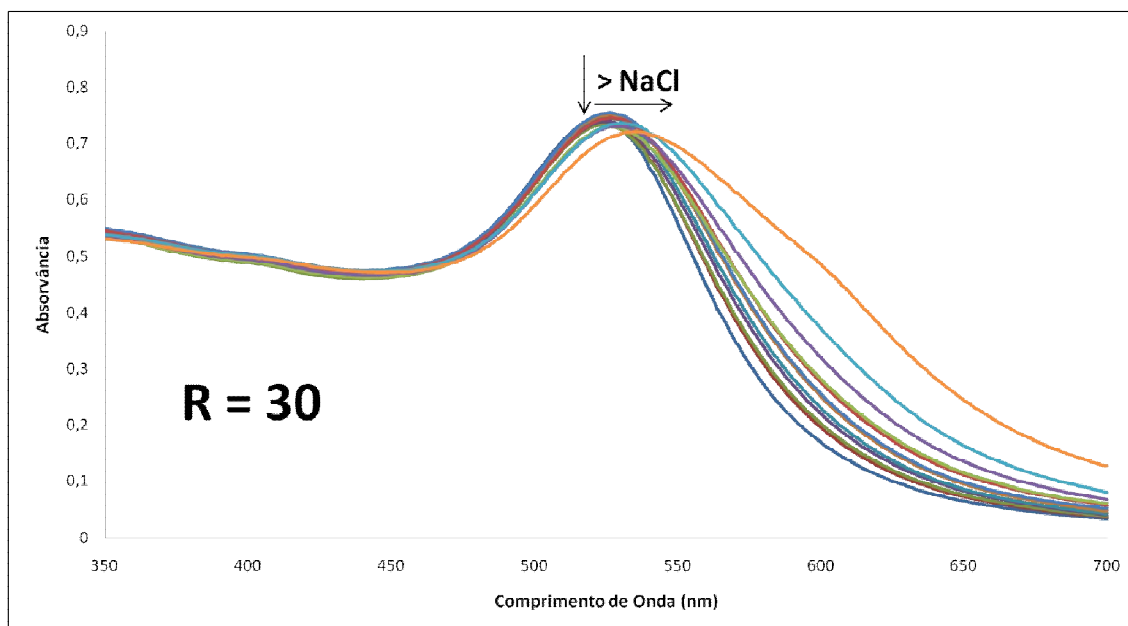
com razões $[PpcA]/[AuNP-MUA]$ diferentes, indicadas sobre o poço respectivo. Os géis correram durante 30 minutos com 150V com tampão TAE 0,125X a pH 8,5.

7.2 Estudo da estabilidade dos bionanoconjugados de PpcA e AuNP-MUA

7.2.1 Estabilidade dos bionanoconjugados a diferentes concentrações de NaCl







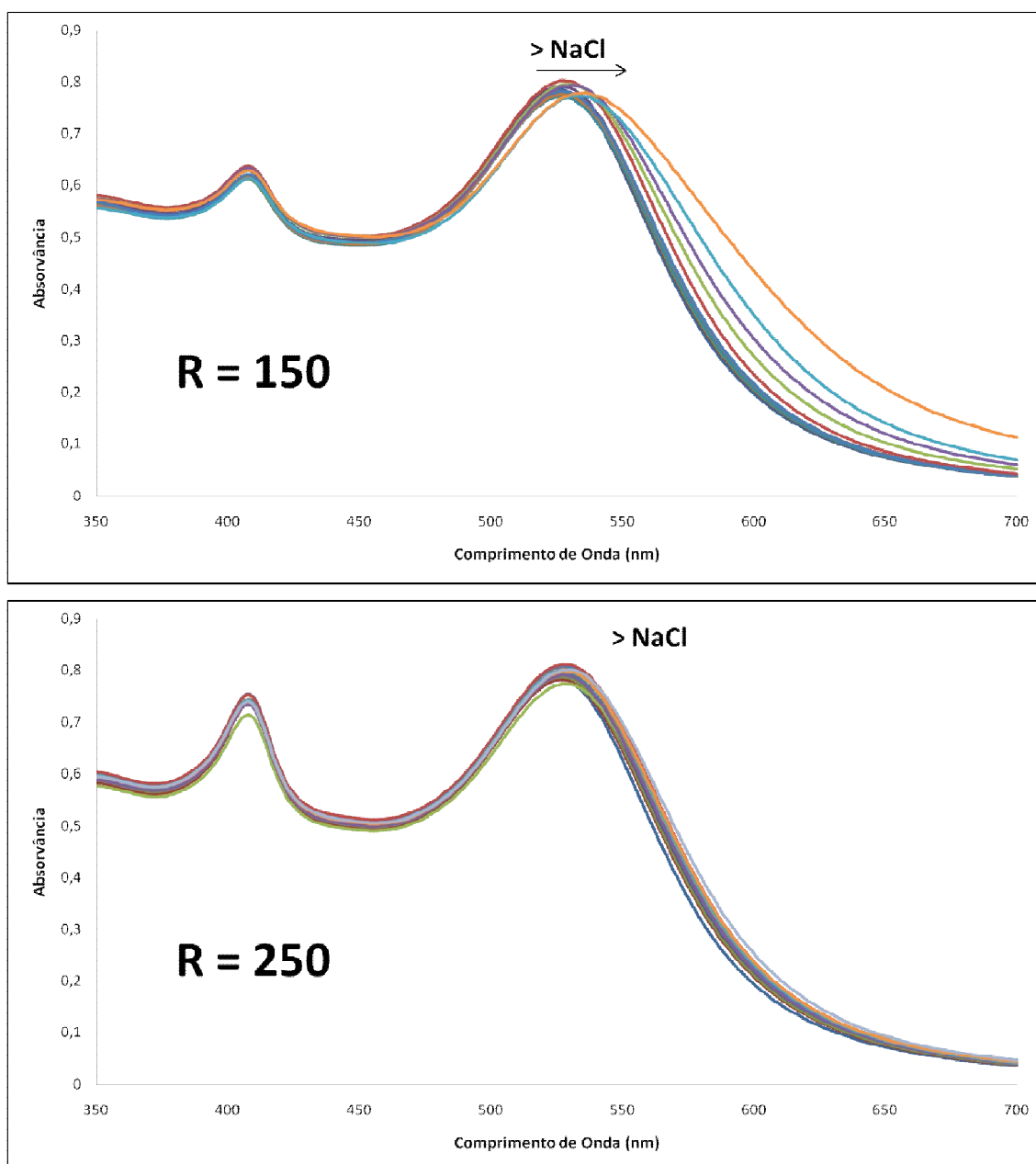
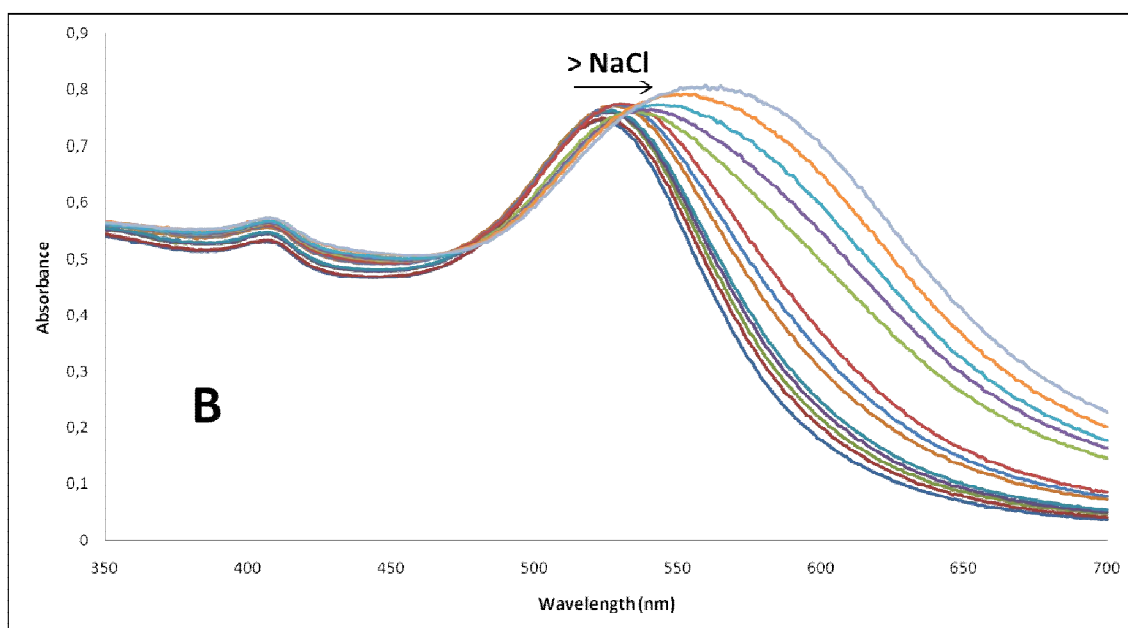
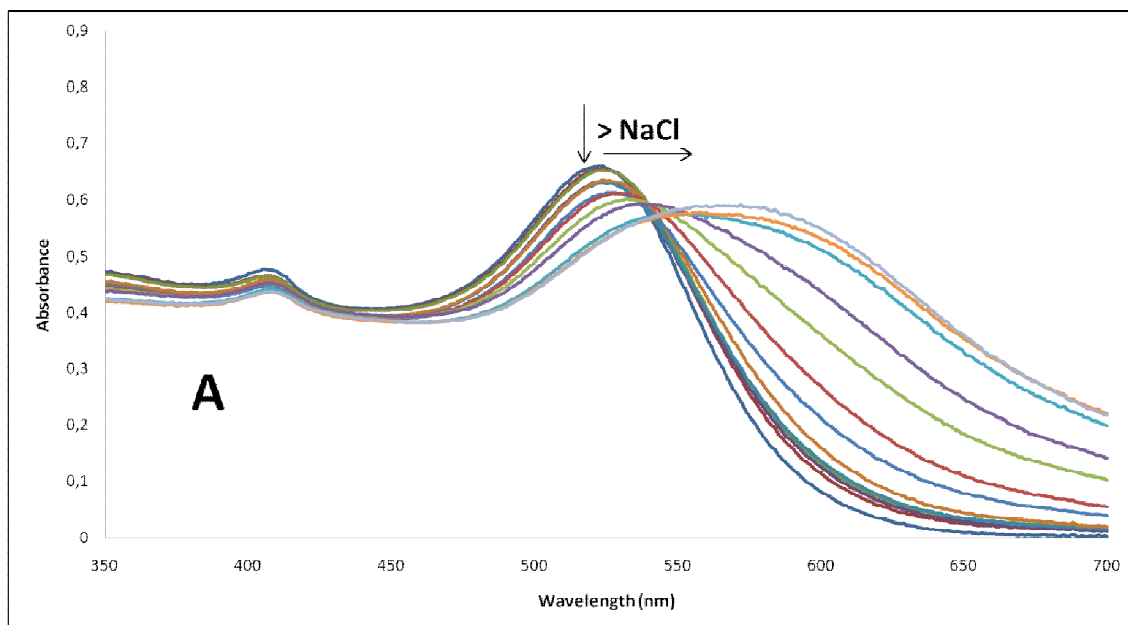


Fig. 7.3 - Espectros de UV/Visível de bionanoconjugados (com 3 nM de AuNP-MUA), com diferentes razões $R = [\text{PpcA}]/[\text{AuNP-MUA}]$, a diferentes concentrações de NaCl.

7.2.2 Estabilidade à agregação por NaCl dos bionanoconjugados ao longo do tempo



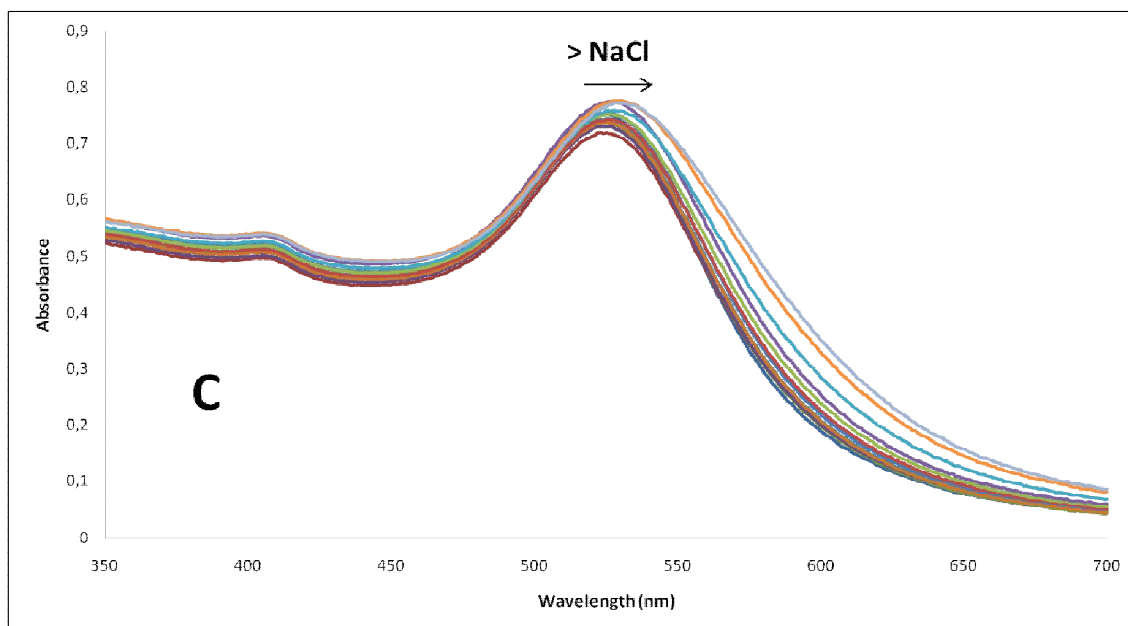


Fig. 7.4 - Espectros de UV/Visível dos bionanoconjugados de razão 75, com 2 (A), 3 (B) e 15 (C) dias de conjugação, a diferentes concentrações de NaCl.